

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

28.09.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1 9 9 9 年 9 月 3 0 日

REC'D 17 NOV 2000

出 願 番 号
Application Number:

平成 1 1 年 特 許 願 第 2 8 0 2 1 0 号

WIPO

PCT

出 願 人
Applicant (s):

斎藤 泉
住友製薬株式会社

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17 (a) OR (b)

2 0 0 0 年 1 1 月 6 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造

出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 0 - 3 0 8 9 9 2 3

【書類名】 特許願
 【整理番号】 SP-11-005
 【提出日】 平成11年 9月30日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 C12N 15/11
 A61K 48/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区代々木2丁目37番15-412号

【氏名】 斎藤 泉

【発明者】

【住所又は居所】 東京都品川区西五反田8丁目10番14-1405号

【氏名】 鐘ヶ江 裕美

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都渋谷区代々木2丁目37番15-412号

【氏名又は名称】 斎藤 泉

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100095832

【弁理士】

【氏名又は名称】 細田 芳徳

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 050739

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9200192

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 変異型 F R T 配列を含有してなる D N A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 酵母 2 ミクロン D N A 由来の下記の野生型 F R T 配列（配列番号：1）：

【化 1】

12345678

5'-GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAAGCTTC-3'

スパーサー領域

において、中央部の 8 塩基（スパーサー領域）の塩基が下記（1）～（4）：

- （1）TCTCTGGA （f 2 1 6 1）
- （2）TCTCCAGA （f 2 1 5 1）
- （3）TATCTTGA （f 2 2 6 2）及び
- （4）TTTCTGGA （f 6 1）

からなる群より選ばれた配列の塩基に置換された配列を有する変異型 F R T 配列（それぞれ配列番号：2～5）を含有してなる D N A。

【請求項 2】 請求項 1 に規定された変異型 F R T 配列において、スパーサー領域を除く領域において少なくとも 1 個の塩基の置換をさらに有する配列からなり、下記（A）及び（B）の性質を有する変異型 F R T 配列を含有してなる D N A：

（A）リコンビナーゼ F L P の存在下でも野生型 F R T 配列との間で特異的 D N A 組換え反応が起こらない、及び

（B）リコンビナーゼ F L P の存在下、同一の配列を有するもう 1 つの変異型 F R T 配列との間で特異的 D N A 組換え反応が起こる。

【請求項 3】 リコンビナーゼ F L P の存在下でも、異なる配列を有するもう 1 つの変異型 F R T 配列との特異的 D N A 組換え反応が起こらない、請求項 1 又は 2 記載の変異型 F R T 配列を含有してなる D N A。

【請求項 4】 少なくとも 1 つの野生型 F R T 配列と少なくとも 1 つの請求

項 1～3 いずれかに規定された変異型 F R T 配列とを含有してなる DNA。

【請求項 5】 野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間に所望の遺伝子を有してなる請求項 4 記載の DNA。

【請求項 6】 互いに異なる配列をもつ少なくとも 2 つの請求項 3 に規定された変異型 F R T 配列を含有してなる DNA。

【請求項 7】 互いに異なる配列をもつ 2 つの変異型 F R T 配列の間に所望の遺伝子を有してなる請求項 6 記載の DNA。

【請求項 8】 請求項 4～7 いずれか記載の DNA により形質転換された細胞。

【請求項 9】 下記の DNA (a) 及び DNA (b) をリコンビナーゼ F L P の存在下に反応させ、下記の DNA (c) を得ることを特徴とする遺伝子置換方法：

DNA (a) : 野生型 F R T 配列、遺伝子 A 及び請求項 1～3 いずれか記載の変異型 F R T 配列をこの順に有する DNA ；

DNA (b) : 野生型 F R T 配列、遺伝子 B 及び DNA (a) と同じ変異型 F R T 配列をこの順に有する DNA ；

DNA (c) : DNA (a) において、遺伝子 A が遺伝子 B に置換された DNA ；

ここで、遺伝子 A 及び遺伝子 B は互いに異なる任意の遺伝子である。

【請求項 10】 下記の DNA (d) 及び DNA (e) をリコンビナーゼ F L P の存在下に反応させ、下記の DNA (f) を得ることを特徴とする遺伝子置換方法：

DNA (d) : 互いに異なる配列をもつ 2 つの請求項 3 に規定された変異型 F R T 配列（それぞれ変異型 F R T 配列 1 及び変異型 F R T 配列 2 という）及び遺伝子 A を変異型 F R T 配列 1、遺伝子 A 及び変異型 F R T 配列 2 の順に有する DNA ；

DNA (e) : 変異型 F R T 配列 1、遺伝子 B 及び変異型 F R T 配列 2 をこの順に有する DNA ；

DNA (f) : DNA (d) において、遺伝子 A が遺伝子 B に置換された DNA

;

ここで、遺伝子A及び遺伝子Bは互いに異なる任意の遺伝子である。

【請求項11】 遺伝子Bが機能的な遺伝子ではないことを特徴とする、請求項9又は10記載の方法。

【請求項12】 遺伝子Aが機能的な遺伝子ではないことを特徴とする、請求項9又は10記載の方法。

【請求項13】 DNA(a)若しくはDNA(d)が細胞の染色体DNAであり、DNA(b)若しくはDNA(e)がプラスミドDNA又は二本鎖環状DNAウイルスである、請求項9～12いずれか記載の方法。

【請求項14】 DNA(a)若しくはDNA(d)が細胞の染色体DNAであり、DNA(b)若しくはDNA(e)が細胞内で変換されることにより二本鎖環状DNAとなる性質を有する、請求項9～12いずれか記載の方法。

【請求項15】 DNA(a)若しくはDNA(d)が二本鎖DNAウイルスの染色体DNAであり、DNA(b)若しくはDNA(e)がプラスミドDNA又は二本鎖環状DNAウイルスである、請求項9～12いずれか記載の方法。

【請求項16】 DNA(a)若しくはDNA(d)が二本鎖DNAウイルスの染色体DNAであり、DNA(b)若しくはDNA(e)が細胞内で変換されることにより二本鎖環状DNAとなる性質を有する、請求項9～12いずれか記載の方法。

【請求項17】 二本鎖DNAウイルスがアデノウイルスである、請求項15又は16記載の方法。

【請求項18】 請求項4～7いずれか記載のDNAを染色体上に有してなるトランスジェニック動物。

【請求項19】 請求項4～7いずれか記載のDNAを含有してなる医薬。

【請求項20】 酵母2ミクロンDNA由来の下記の野生型FRT配列（配列番号：1）：

【化 2】

12345678

5'-GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAAGTTC-3'

スパーサー領域

において、スパーサー領域の 7 番目の塩基に G から C への置換を有する 2 つの変異型 F R T 配列（配列番号：3 2）を用い、リコンビナーゼ F L P の存在下に特異的 D N A 組換え反応を行なう方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、変異型 F R T 配列を含有してなる D N A とその応用に関する。さらに詳しくは、野生型 F R T 配列とは特異的組換え反応は起こさないが変異型同士では特異的組換え反応を起こす変異型 F R T 配列と、該変異型 F R T 配列を用いた遺伝子置換方法並びに特異的 D N A 組換え方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の 2 ミクロン D N A によりコードされるリコンビナーゼ F L P は、F R T 配列と呼ばれる 34 塩基の特定の D N A 配列を認識し、2 つの F R T 配列間で D N A 鎖の切断、鎖の交換と結合の全行程を行なう部位特異的な D N A 組換え酵素である (Babineau et al., J. Biol. Chem., Vol. 260, 12313-12319 (1985))。同一 D N A 分子上に同方向の 2 つの F R T 配列が存在する場合は、リコンビナーゼ F L P によりその間に挟まれた D N A 配列が切り出されて環状分子となり（切り出し反応）、またその逆に、異なる D N A 分子上に 2 つの F R T 配列が存在し、その一方が環状 D N A である場合は、F R T 配列を介して環状 D N A が他方の D N A 分子上に挿入される（挿入反応）。

【0 0 0 3】

挿入反応と切り出し反応は可逆的であるが、挿入反応により同一 D N A 分子上に 2 つの F R T 配列が存在すると、ただちに切り出し反応も起こるため、反応の

平衡は切り出し反応側に偏っている。従って、挿入反応により任意のDNAを他のDNA分子上に挿入できる頻度は極めて低いことが知られている。

【0004】

FRT配列は34塩基のDNA配列からなり (Jayaram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 82. 5875-5879 (1985))、2つの13塩基の逆方向反復配列 (inverted repeat) に挟まれた8塩基の配列はスペーサー領域と呼ばれ、DNA鎖の組換えはスペーサー領域で行われることが知られている (Umlauf SW. et al., EMBO Journal, Vol.7. 1845-1852 (1988)、Lee J. et al., EMBO Journal, Vol.18. 784-791, 1999)。FRT配列 (配列番号: 1) を示す。

【0005】

【化3】

12345678

5'-GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAAGTTC-3'

スペーサー領域

【0006】

このスペーサー領域の塩基を本来のFRT配列 (野生型FRT配列) とは異なる塩基に変える (変異型FRT配列) ことにより、野生型FRT配列との間では特異的DNA組換え反応が起きないが、2つの変異型FRT配列間では特異的DNA組換え反応が起きることが発見された (Schlake T. et al., Biochemistry, Vol.33. 12746-12751 (1994))。さらに、この変異型FRT配列を用い、動物由来培養細胞において、リコンビナーゼFLPの存在下に異なる2つのDNA分子に存在する遺伝子を置換できることが示された。すなわち、あるDNA分子の変異型FRT配列と野生型FRT配列との間に存在する遺伝子Aを、他のDNA分子上に存在する変異型FRT配列と野生型FRT配列との間に存在する遺伝子Bと置換できることが示された (Schlake T. et al., Biochemistry, Vol.33. 12746-12751 (1994)、Seibler J. et al., Biochemistry, Vol.36. 1740-1747 (1997))。

【0007】

F R T 配列のスペーサー領域に変異を導入した既存の変異型 F R T 配列として、TATTTGAA (F3という) をスペーサー領域に有する配列 (配列番号: 6) が知られている (前述 Seibler J. ら)。Seibler らは、この変異型 F R T 配列 (F3) と野生型 F R T 配列とを用い、動物細胞染色体での遺伝子置換を行なったが、置換前後の遺伝子に薬剤耐性遺伝子を用い、薬剤選択により遺伝子置換された細胞の濃縮を行なったにもかかわらず、遺伝子置換効率は 21-38 % に過ぎなかった (Seibler J. et al., Biochemistry, Vol.37, 6229-6234 (1998))。薬剤選択を行わなければ、この遺伝子置換効率はさらに低下すると考えられる。すなわち、先行技術の F3 の変異は、効率の良い遺伝子置換反応を行なうには不十分な配列であり、より効率の良い変異型 F R T 配列が求められている。

【0008】

また、CTTGTGAA (F5 という) のスペーサー領域を有する変異型 F R T 配列 (配列番号: 7) を用いた遺伝子置換の効率も実用には不十分である。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、リコンビナーゼ F L P の存在下、野生型 F R T 配列とは組換え反応が起きないが、同一配列の 2 つの変異型 F R T 配列間では組換え反応が起こる変異型 F R T 配列を含有した DNA を提供することである。さらに本発明の目的は、野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列又は異なる配列の変異型 F R T 配列の組み合わせにより、動物細胞をはじめとする高等真核細胞で、効率の高い遺伝子挿入もしくは遺伝子置換を行なう方法を提供し、その方法を動植物細胞への遺伝子導入、組換えウイルス作製、動植物個体での遺伝子操作などに応用することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、目的の変異型 F R T 配列を検索するため、F L P 依存 DNA 組換え反応の効率を測定する非常に鋭敏かつ直接的な in vitro の試験方法の開発に成功した。この試験法を用い、F R T 配列のスペーサー領域を他の塩基に置換した新たな変異型 F R T 配列の DNA 組換え反応の効率を測定することにより、野

生型 F R T 配列とは組換え反応が起きないが、同一配列の 2 つの変異型 F R T 配列間での組換え反応が起こる新たな変異型 F R T 配列を発見することに成功した。

【0011】

すなわち、本発明は、

〔1〕 酵母 2 ミクロン DNA 由来の下記の野生型 F R T 配列（配列番号：1）

:

【0012】

【化 4】

12345678

5'-GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAAGCTTC-3'

スパーサー領域

【0013】

において、中央部の 8 塩基（スパーサー領域）の塩基が下記（1）～（4）：

（1）TCTCTGGA （f 2 1 6 1）

（2）TCTCCAGA （f 2 1 5 1）

（3）TATCTTGA （f 2 2 6 2）及び

（4）TTTCTGGA （f 6 1）

からなる群より選ばれた配列の塩基に置換された配列を有する変異型 F R T 配列（それぞれ配列番号：2～5）を含有してなる DNA、

〔2〕 前記〔1〕に規定された変異型 F R T 配列において、スパーサー領域を除く領域において少なくとも 1 個の塩基の置換をさらに有する配列からなり、下記（A）及び（B）の性質を有する変異型 F R T 配列を含有してなる DNA：

（A）リコンビナーゼ F L P の存在下でも野生型 F R T 配列との間で特異的 DNA 組換え反応が起こらない、及び

（B）リコンビナーゼ F L P の存在下、同一の配列を有するもう 1 つの変異型 F R T 配列との間で特異的 DNA 組換え反応が起こる、

〔3〕 リコンビナーゼ F L P の存在下でも、異なる配列を有するもう 1 つの変

異型 F R T 配列との特異的 D N A 組換え反応が起こらない、前記〔1〕又は〔2〕記載の変異型 F R T 配列を含有してなる D N A、

〔4〕 少なくとも 1 つの野生型 F R T 配列と少なくとも 1 つの前記〔1〕～〔3〕いずれかに規定された変異型 F R T 配列とを含有してなる D N A、

〔5〕 野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間に所望の遺伝子を有してなる前記〔4〕記載の D N A、

〔6〕 互いに異なる配列をもつ少なくとも 2 つの前記〔3〕に規定された変異型 F R T 配列を含有してなる D N A、

〔7〕 互いに異なる配列をもつ 2 つの変異型 F R T 配列の間に所望の遺伝子を有してなる前記〔6〕記載の D N A、

〔8〕 前記〔4〕～〔7〕いずれか記載の D N A により形質転換された細胞、

〔9〕 下記の D N A (a) 及び D N A (b) をリコンビナーゼ F L P の存在下に反応させ、下記の D N A (c) を得ることを特徴とする遺伝子置換方法：

D N A (a)：野生型 F R T 配列、遺伝子 A 及び前記〔1〕～〔3〕いずれか記載の変異型 F R T 配列をこの順に有する D N A；

D N A (b)：野生型 F R T 配列、遺伝子 B 及び D N A (a) と同じ変異型 F R T 配列をこの順に有する D N A；

D N A (c)：D N A (a) において、遺伝子 A が遺伝子 B に置換された D N A；

ここで、遺伝子 A 及び遺伝子 B は互いに異なる任意の遺伝子である、

〔10〕 下記の D N A (d) 及び D N A (e) をリコンビナーゼ F L P の存在下に反応させ、下記の D N A (f) を得ることを特徴とする遺伝子置換方法：

D N A (d)：互いに異なる配列をもつ 2 つの前記〔3〕に規定された変異型 F R T 配列（それぞれ変異型 F R T 配列 1 及び変異型 F R T 配列 2 という）及び遺伝子 A を変異型 F R T 配列 1、遺伝子 A 及び変異型 F R T 配列 2 の順に有する D N A；

D N A (e)：変異型 F R T 配列 1、遺伝子 B 及び変異型 F R T 配列 2 をこの順に有する D N A；

D N A (f)：D N A (d) において、遺伝子 A が遺伝子 B に置換された D N A

;

ここで、遺伝子 A 及び遺伝子 B は互いに異なる任意の遺伝子である、

〔1 1〕 遺伝子 B が機能的な遺伝子ではないことを特徴とする、前記〔9〕又は〔1 0〕記載の方法、

〔1 2〕 遺伝子 A が機能的な遺伝子ではないことを特徴とする、前記〔9〕又は〔1 0〕記載の方法、

〔1 3〕 DNA (a) 若しくは DNA (d) が細胞の染色体 DNA であり、DNA (b) 若しくは DNA (e) がプラスミド DNA 又は二本鎖環状 DNA ウィルスである、前記〔9〕～〔1 2〕いずれか記載の方法、

〔1 4〕 DNA (a) 若しくは DNA (d) が細胞の染色体 DNA であり、DNA (b) 若しくは DNA (e) が細胞内で変換されることにより二本鎖環状 DNA となる性質を有する、前記〔9〕～〔1 2〕いずれか記載の方法、

〔1 5〕 DNA (a) 若しくは DNA (d) が二本鎖 DNA ウィルスの染色体 DNA であり、DNA (b) 若しくは DNA (e) がプラスミド DNA 又は二本鎖環状 DNA ウィルスである、前記〔9〕～〔1 2〕いずれか記載の方法、

〔1 6〕 DNA (a) 若しくは DNA (d) が二本鎖 DNA ウィルスの染色体 DNA であり、DNA (b) 若しくは DNA (e) が細胞内で変換されることにより二本鎖環状 DNA となる性質を有する、前記〔9〕～〔1 2〕いずれか記載の方法、

〔1 7〕 二本鎖 DNA ウィルスがアデノウイルスである、前記〔1 5〕又は〔1 6〕記載の方法、

〔1 8〕 前記〔4〕～〔7〕いずれか記載の DNA を染色体上に有してなるトランスジェニック動物、

〔1 9〕 前記〔4〕～〔7〕いずれか記載の DNA を含有してなる医薬、

〔2 0〕 酵母 2 ミクロン DNA 由来の下記の野生型 F R T 配列（配列番号：1）：

〔0 0 1 4〕

【化 5】

12345678

5'-GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAAGCTTC-3'

スパーサー領域

【0 0 1 5】

において、スパーサー領域の 7 番目の塩基に G から C への置換を有する 2 つの変異型 F R T 配列（配列番号：3 2）を用い、リコンビナーゼ F L P の存在下に特異的 D N A 組換え反応を行なう方法、

に関する。

【0 0 1 6】

【発明の実施の形態】

本発明の変異型 F R T 配列を含有してなる D N A は、酵母 2 ミクロン D N A 由来の下記の野生型 F R T 配列（配列番号：1）：

【0 0 1 7】

【化 6】

12345678

5'-GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAAGCTTC-3'

スパーサー領域

【0 0 1 8】

において、中央部の 8 塩基（スパーサー領域）の塩基が下記（1）～（4）：

（1）T C T C T G G A （f 2 1 6 1）

（2）T C T C C A G A （f 2 1 5 1）

（3）T A T C T T G A （f 2 2 6 2）及び

（4）T T T C T G G A （f 6 1）

からなる群より選ばれた配列の塩基に置換された配列を有する変異型 F R T 配列（それぞれ、配列番号：2～5）を含有してなる D N A である。

【0 0 1 9】

本発明において、「リコンビナーゼ F L P」とは、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の 2 ミクロン DNA によりコードされ、2 つの F L P の認識配列 (F R T 配列) 間の部位特異的組換え反応を行なう酵素をいう (Babineau et al., J. Biol. Chem., Vol. 260, 12313-12319 (1985))。リコンビナーゼ F L P により、同一方向に配置された 2 つの F R T 配列に挟まれた領域を切り出すことが可能である。

【0 0 2 0】

本発明において、「F R T 配列」とは、配列番号：1 に示される 34 塩基からなる DNA 配列 (Jayaram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 82, 5875-5879 (1985)) をいう。「スペーサー領域」とは、前記 F R T 配列中の 2 つの逆方向反復配列 (13bp) に挟まれた 8 塩基の DNA 配列をいう。本明細書においては、この 34 塩基からなる F R T 配列を特に「野生型 F R T 配列」と称する。

【0 0 2 1】

本発明において、「変異型 F R T 配列」とは、上記野生型 F R T 配列の少なくとも 1 つの塩基が他の塩基に置換された DNA 配列のことをいう。本発明において、「スペーサー領域を置換した変異型 F R T 配列」とは、野生型 F R T 配列の 8 塩基のスペーサー領域のうち少なくとも 1 つの塩基が他の塩基に置換された DNA 配列のことをいう。

【0 0 2 2】

本発明の変異型 F R T 配列を含有してなる DNA は、前述した変異型 F R T 配列のうち、野生型 F R T 配列とは F L P 依存 DNA 組換え反応が起こらないが、同一配列の 2 つの変異型 F R T 配列間での組換え反応が起こる変異型 F R T 配列を含有してなる DNA である。従って、スペーサー領域だけでなく逆方向反復配列部の塩基がさらに置換されている変異型 F R T 配列であっても、上記性質を満たす限りは本発明の変異型 F R T 配列に含まれる。

【0 0 2 3】

すなわち、本発明の変異型 F R T 配列を含有してなる DNA には、変異型 F R T 配列において、スペーサー領域を除く領域において少なくとも 1 個の塩基の置換をさらに有する配列からなり、下記 (A) 及び (B) の性質：

(A) リコンビナーゼ FLP の存在下でも野生型 FRT 配列との間で特異的 DNA 組換え反応が起こらない、及び

(B) リコンビナーゼ FLP の存在下、同一の配列を有するもう 1 つの変異型 FRT 配列との間で特異的 DNA 組換え反応が起こる、
を有する変異型 FRT 配列を含有してなる DNA も含まれる。

【0024】

かかる DNA には、リコンビナーゼ FLP の存在下でも、異なる配列を有するもう 1 つの変異型 FRT 配列との特異的 DNA 組換え反応が起こらないという性質を有する配列を含有した DNA も含まれる。

【0025】

なお、本明細書においては、「野生型 FRT 配列」と「変異型 FRT 配列」とを包括的に、単に「FRT 配列」と称する場合がある。

【0026】

本明細書において、「リコンビナーゼ FLP の存在下での特異的 DNA 組換え反応」と「FLP 依存 DNA 組換え反応」とは同じ意味であり、リコンビナーゼ FLP の存在する条件下に、2 つの FRT 配列を含有してなる DNA の間で起こる、DNA 鎖の切断、DNA 鎖の交換と結合の全行程の反応のことをいう。

【0027】

本発明の変異型 FRT 配列を含有してなる DNA としては、例えば、少なくとも 1 つの野生型 FRT 配列と少なくとも 1 つの前記変異型 FRT 配列とを含有した DNA 並びに互いに異なる配列をもつ少なくとも 2 つの前記変異型 FRT 配列を含有した DNA 等が挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

【0028】

かかる DNA を用いて、2 つの FRT 配列の間、すなわち FRT 配列と FRT 配列との間に所望の遺伝子を有する DNA を作製し、得られた DNA を遺伝子置換法に用いることができる。かかる DNA も本発明に含まれる。具体的には、野生型 FRT 配列と変異型 FRT 配列との間に所望の遺伝子を有した DNA、互いに異なる 2 つの変異型 FRT 配列の間に所望の遺伝子を有した DNA が挙げられる。

【 0 0 2 9 】

前記「所望の遺伝子」は、特に制限はなく、タンパク質をコードする遺伝子や、プロモーターやポリ A 配列などの構造遺伝子、あるいはリンカー等の機能を有しない遺伝子であってもよい。

【 0 0 3 0 】

本明細書において、「遺伝子置換」とは、異なる 2 つの DNA 分子上に存在する遺伝子を入れ換えることをいう。リコンビナーゼ FLP の存在下に、野生型 FRT 配列と変異型 FRT 配列とを用いて遺伝子置換を行なう方法の概念は、既存の文献 (Schlake T. et al., Biochemistry, Vol.33, 12746-12751 (1994)) に開示されている。

【 0 0 3 1 】

本発明の変異型 FRT 配列を含有した DNA を用いた遺伝子置換法の DNA 組換え反応効率は、本発明者らが開発した非常に鋭敏かつ直接的な in vitro の FLP 依存 DNA 組換え反応効率の測定方法により行なうことができる。

【 0 0 3 2 】

本測定方法の概略は、適当な長さの DNA に 2 つの FRT 配列を挿入した基質 DNA をリコンビナーゼ FLP 存在下に一定時間反応後、適当な制限酵素で消化し、電気泳動により分離した DNA バンドのサイズから反応効率を測定するものである。反応前の基質 DNA バンドの量と組換え反応により生じた DNA バンドの量が直接比較できるため、DNA 組換え反応効率を定量的に測定できる。すでに本発明者らは、同様の原理で他のリコンビナーゼである P1 ファージ由来の Cre 依存 DNA 組換え反応の効率を測定する方法を確立している (Lee, G. et al., Gene Vol.14, 55-65 (1998))。以下に本測定方法を詳しく説明する。

【 0 0 3 3 】

まず、野生型 FRT 配列及びそのスペーサー領域を他の塩基に置換した変異型 FRT 配列を有する DNA を合成する。当該 DNA を合成する方法としては、PCR 法、部位特異的変異法など特に制限はないが、DNA 合成機等を用いて化学的に相補的な一本鎖 DNA を合成し、その後相補鎖をアニーリングし二本鎖 DNA として用いるのが望ましい。FRT 配列を有する DNA は、34 塩基の FRT 配列

を含んでいれば特に制限はないが、F R T 配列以外に制限酵素の認識配列を含むことが望ましい。

【0 0 3 4】

次に、野生型または変異型 F R T 配列を有する上記 D N A を、適当な長さの D N A 断片、例えばプラスミド pBR322 を制限酵素消化して直鎖状にした D N A 断片の両端に連結し、両端に 2 つの野生型 F R T 配列もしくは、2 つの同じ配列の変異型 F R T 配列を有する直鎖状 D N A 断片を調製する。次いで、この D N A 断片に適当な長さの D N A 断片、例えば、アデノウイルス由来の D N A 断片を連結したプラスミドを作製し、これを制限酵素消化して直鎖状の基質 D N A を調製する。また、野生型 F R T 配列を 1 つ有するプラスミドから、同様の方法により、野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列とを有する直鎖状の基質 D N A を調製する。

【0 0 3 5】

リコンビナーゼ F L P を含む酵素溶液の調製法は特に制限はなく、リコンビナーゼ F L P を発現するように工夫された酵母、大腸菌等や、培養細胞などから調製できるが、リコンビナーゼ F L P を発現する組換えアデノウイルスを感染させた培養細胞の抽出液を用いることが好ましい。その理由は、組換えアデノウイルス感染細胞では、目的のタンパク質を大量に発現するからである。

【0 0 3 6】

以上の基質 D N A とリコンビナーゼ F L P を含む酵素溶液とを一定時間反応させた後、反応液を適当な制限酵素で消化し、アガロース電気泳動で生じた D N A バンドを解析する。この測定方法では、未反応の基質 D N A 、組換え反応により生じた D N A 、及び組換え反応の中間体 D N A の量を直接比較できるため、2 つの同じ配列の変異型 F R T 配列間、及び野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間での組換え反応の効率を定量的にかつ高感度に測定できる。

【0 0 3 7】

本発明者らは、F R T 配列のスペーサー領域の 2 番目の塩基の変異と 5 ～ 7 番目の塩基の変異の組合せが特に重要との仮説を立て、f2161 （配列番号：2）、f2151 （配列番号：3）、f2262 （配列番号：4）、f2272 （配列番号：8）、f2373 （配列番号：9）の 5 種類の変異型 F R T 配列を考案した。さらに、2 塩

基置換との比較のため、1塩基のみ置換したf61変異型F R T配列（配列番号：5）も考案した。

【0038】

次いで、前記6種類の変異型F R T配列に関して、同じ配列を有する2つの変異型F R T配列間での組換え反応の効率を、前記測定系で測定する。なお比較のため、先行技術の変異であるF3ならびにその他の1塩基置換の2種類の変異型F R T配列（図2参照）についても測定した。

【0039】

先行技術であるF3の配列を有する変異型F R T配列の組換え効率は、野生型F R T配列の約65%であり、十分な組換え効率でないことが示された。一方、本発明のf2161とf2262の変異型F R T配列は、F3よりも高い組換え効率を示し、f2151とf61それぞれの組換え効率は、F3とほぼ同じかやや低いものの実用上十分に使用可能な効率であった。すなわち、f2161、f2262、f2151及びf6の各変異型F R T配列は、本発明の目的を達しうる変異型F R T配列である。また、配列公知のf72（配列番号：32）は、予想外の結果を示し、野生型F R T配列の2倍以上の組換え効率を示した。すなわち、f72は、野生型F R T配列よりも効率の高い、F L P依存DNA組換え反応の基質として用いることができる。

【0040】

さらに、野生型F R T配列と変異型F R T配列間での組換え反応の効率を同様に測定することにより、野生型F R T配列とは特異的組換え反応は起こさないが変異型同士では特異的組換え反応を起こす変異型F R T配列を目的の変異型F R T配列として選択することができる。

【0041】

本発明の変異型F R T配列を含有してなるDNAにより、遺伝子置換効率のよい遺伝子置換方法が可能になる。かかる遺伝子置換方法も本発明に含まれる。

【0042】

本発明の遺伝子置換方法としては、下記のDNA（a）及びDNA（b）をリコンビナーゼF L Pの存在下に反応させ、下記のDNA（c）を得ることを特徴とする遺伝子置換方法（以下、「遺伝子置換方法1」という場合がある）：

DNA (a) : 野生型 F R T 配列、遺伝子 A 及び本発明の変異型 F R T 配列をこの順に有する DNA ;

DNA (b) : 野生型 F R T 配列、遺伝子 B 及び DNA (a) と同じ変異型 F R T 配列をこの順に有する DNA ;

DNA (c) : DNA (a) において、遺伝子 A が遺伝子 B に置換された DNA ;

並びに

下記の DNA (d) 及び DNA (e) をリコンビナーゼ F L P の存在下に反応させ、下記の DNA (f) を得ることを特徴とする遺伝子置換方法 (以下、「遺伝子置換方法 2」という場合がある) :

DNA (d) : 互いに異なる配列をもつ 2 つの本発明の変異型 F R T 配列 (それぞれ変異型 F R T 配列 1 及び変異型 F R T 配列 2 という) 及び遺伝子 A を変異型 F R T 配列 1、遺伝子 A 及び変異型 F R T 配列 2 の順に有する DNA ;

DNA (e) : 変異型 F R T 配列 1、遺伝子 B 及び変異型 F R T 配列 2 をこの順に有する DNA ;

DNA (f) : DNA (d) において、遺伝子 A が遺伝子 B に置換された DNA ;

が挙げられる。ここで、遺伝子 A 及び遺伝子 B は互いに異なる任意の遺伝子である。また、遺伝子 A 及び遺伝子 B は、それぞれ、機能的な遺伝子ではないものでもよい。

【0043】

本明細書において、「機能的な遺伝子でない」とは、構造遺伝子の既知の機能または制御機能をもたない DNA 配列であることを意味する。かかる例示としては、リンカー等が挙げられる。

【0044】

本発明の遺伝子置換方法の具体例として、遺伝子置換方法 1 (野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列を用いた方法) について説明するが、遺伝子置換方法 2 (変異型 F R T 配列 1 と変異型 F R T 配列 2 を用いた方法) の場合も同様である。また、動物細胞の染色体の遺伝子を置換する場合を例として説明するが、本方法

は動物細胞の染色体に限らず、動物ウイルスのゲノムや、植物細胞、酵母または細菌等の微生物の染色体や、バクテリオファージなどにも適用できる。

【 0 0 4 5 】

まず、動物細胞の染色体にあらかじめ野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列とを挿入しておく。野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間には任意の遺伝子 A が存在してよく、この場合は遺伝子置換となる。一方、遺伝子 A が存在しない場合には、遺伝子挿入となる。

【 0 0 4 6 】

一方、野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列とを挿入した環状 DNA 分子内の 2 つの F R T 配列の間に、導入しようとする遺伝子 B を挿入しておく（野生型 F R T 配列／遺伝子 B／変異型 F R T 配列と称す）。

【 0 0 4 7 】

この「環状 DNA 分子」は、例えば、プラスミド DNA や二本鎖環状 DNA ウイルスのようにあらかじめ環状である分子であってもよく、また常法により細胞内に導入後、細胞内で変換されることにより二本鎖環状 DNA となる性質を有する分子であってもよい。

【 0 0 4 8 】

前記野生型 F R T 配列／遺伝子 B／変異型 F R T 配列を含む環状 DNA 分子を公知の方法により前述した細胞内に導入し、同時に公知の方法によりリコンビナーゼ F L P を細胞内で発現させることにより、環状 DNA 分子上の遺伝子 B が細胞の染色体上の野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間に挿入される。その際、細胞の染色体上の 2 つの F R T 配列の間に遺伝子 A が存在する場合は、この遺伝子 A が除かれ遺伝子 B が挿入される遺伝子置換となる。染色体上の 2 つの F R T 配列の間に遺伝子が存在しない場合には遺伝子挿入となる。さらに、環状 DNA の 2 つの F R T 配列の間に遺伝子が存在しない場合は、染色体上の遺伝子 A を除くこと（遺伝子欠失）ができる。また、遺伝子 A を除いても染色体上には 2 つの F R T 配列は存在するので、2 つの F R T 配列の間に任意の遺伝子 C を有する別の環状 DNA 分子を用いることにより、再びこの染色体上の 2 つの F R T 配列間に遺伝子を導入することができる。前記遺伝子挿入及び遺伝子欠失も本発明

の遺伝子置換法の範囲に含まれる。

【 0 0 4 9 】

細胞にDNA分子を導入する方法としては、一般的に用いられている方法を使用することができる。その例として、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAE-dextran法、リポフェクション法、遺伝子銃等の物理化学的方法、環状DNAウイルス等の生物学的方法等が挙げられる。

【 0 0 5 0 】

環状DNAウイルスとしては、用いる細胞の種類により異なるが、例えば、パピローマウイルスやSV40などが挙げられる。

【 0 0 5 1 】

細胞内に導入後、環状分子とする方法の例としては、リコンビナーゼを用いる方法が挙げられ、リコンビナーゼとしては、バクテリオファージP1由来のリコンビナーゼ Cre (Sternberg et al., J. Mol. Biol. Vol.150, 467-486 (1981))、チゴサッカロマイセス・ルーイのpSR1プラスミド由来のR (Matsuzaki et al., Mol. Cell. Biol. Vol.8, 955-962 (1988))、リコンビナーゼFLPなどが挙げられる。

【 0 0 5 2 】

細胞中の染色体にあらかじめ2つのFRT配列を挿入する場合、例えば、2つのFRT配列が存在するプラスミドDNA等を用いて細胞を形質転換すればよい。

【 0 0 5 3 】

形質転換時の遺伝子導入方法としては、前述した物理化学的方法が挙げられる。さらに、レトロウイルスやアデノ随伴ウイルス、HIV等の、ウイルスゲノムを細胞の染色体に挿入する性質を有するウイルスを用いてもよい。

【 0 0 5 4 】

動物細胞内でリコンビナーゼFLPを発現させる方法としては、リコンビナーゼFLPの遺伝子を保持したDNAやRNAを細胞に導入後、細胞内でリコンビナーゼFLPを発現させる方法（リコンビナーゼFLP遺伝子導入法）、リコンビナーゼFLPタンパク質そのものを細胞内に導入する方法（リコンビナーゼF

L P タンパク質導入法) 等が挙げられる。

【0 0 5 5】

リコンビナーゼ F L P 遺伝子導入法の例としては、F L P の遺伝子を保持した D N A や R N A を前述した物理化学的方法で細胞に導入する方法や、ウイルスベクターを用いる方法が挙げられる。ウイルスベクターとしては、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、EBウイルスなどが挙げられるが、その遺伝子導入効率の高さからアデノウイルスが好適である。

【0 0 5 6】

本発明の変異型 F R T 配列を含有してなる D N A を用いた細胞染色体上での遺伝子置換法の利点は、その効率の高さと染色体の特定の部位に遺伝子を挿入できることである。特に、染色体の特定部への遺伝子導入は、形質転換細胞を取得する上では極めて重要である。

【0 0 5 7】

その理由は、D N A を用いた通常の形質転換法（相同組換え以外の方法）や、レトロウイルスやアデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターを用いた従来の方法では、染色体上での目的遺伝子の挿入部位はランダムであるため、挿入部位により目的遺伝子の発現量及びその染色体での安定性に大きな差がある。したがって、例えば、目的遺伝子を安定に（長期間）、かつ高発現が可能な形質転換細胞株を得るには、非常に多くの細胞株をスクリーニングする必要があり、しかも、1 遺伝子ごとに、すなわち 1 回の形質転換ごとに、このスクリーニングを繰り返さなければならないという煩雑な操作を要する。それに対し、本発明による遺伝子置換方法によれば、2 つの F R T 配列に挟まれたある遺伝子の発現を指標にして、その発現量が高く安定な細胞株を一旦取得すれば、任意のどの遺伝子を導入しても、遺伝子の発現が高く安定な細胞株を容易に取得することができる。しかも、その効率は極めて高いため、通常必要な薬剤選択の操作が必要なく、細胞のクローン化の操作だけで目的の細胞株を短期間に取得することができる。対象とする細胞株に特に制限はないが、トランスジェニック動物の作製に用いる ES 細胞などの形質転換には、特に有効である。

【0 0 5 8】

本発明には、前記変異型 F R T 配列を含有してなる DNA により形質転換された細胞も含まれる。

【0059】

本発明の遺伝子置換方法は、培養細胞だけでなく動物個体に対しても適用できる。特定の外来遺伝子を動物個体で発現させる方法として、トランスジェニック動物の技術がある。しかしながら、通常の方法でトランスジェニック動物を作製するには、まず目的遺伝子を発現する ES 細胞等を作製し、次いでこの ES 細胞等を仮親の腹で発生させ、生まれた子どもについて目的遺伝子の発現を指標にスクリーニングし、さらに目的遺伝子を発現している動物個体をかけ合わせて初めて多数のトランスジェニック動物が得られるという複雑な操作が必要である。したがって目的の遺伝子を発現するトランスジェニック動物の作製には非常に時間がかかるという欠点を有する。通常これらの操作には半年から 1 年を要する。

【0060】

本発明の遺伝子置換法を用いた場合、一旦遺伝子導入用のトランスジェニック動物を作製すれば、個々の遺伝子に応じたトランスジェニック動物の作製は不要となる。遺伝子導入用のトランスジェニック動物とは、染色体に変異型 F R T 配列と野生型 F R T 配列とを挿入した動物で、その作製は従来のトランスジェニック動物作製と同様の方法で行ない、薬剤による選択のため 2 つの F R T 配列の間にネオマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子を挿入してもおいてもよい。かかる遺伝子導入用動物に、DNA (a) : 野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間に目的遺伝子を挿入した DNA、すなわち、野生型 F R T 配列、遺伝子 A 及び前記変異型 F R T 配列をこの順に有する環状 DNA とリコンビナーゼ F L P とを導入することにより、DNA (a) とリコンビナーゼ F L P の両者が導入された組織や細胞で目的遺伝子が染色体に挿入され、その遺伝子を発現させることができる。動物個体への DNA (a) とリコンビナーゼ F L P との導入は、リポソーム法やウイルスベクター、遺伝子銃など既存の方法で十分に行なうことができる。

【0061】

本発明の方法を用いれば、異なる遺伝子を導入する場合でも、遺伝子に応じた

DNA (a) を用いるだけでよく、非常に時間のかかるトランスジェニック動物の作製を行なう必要がない。本発明は、前記変異型 FRT 配列を含有した DNA を染色体上に有してなるトランスジェニック動物をも包含する。

【0062】

さらに、DNA (a) とリコンビナーゼ FLP の両者を局所的に導入するだけで、目的の臓器や組織にのみ目的遺伝子を挿入することもできる。

【0063】

本発明の遺伝子置換方法は、組換えウイルスの作製にも用いることができる。ウイルスとして DNA ウイルスが挙げられ、DNA ウイルスとして、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、EB ウイルス、サイトメガロウイルス等のヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、カナリアボックスウイルス等のボックスウイルス、昆虫のバキュロウイルス等が挙げられる。また、ウイルスとして RNA ウイルスが挙げられ、特にレトロウイルスの作製に好適である。

【0064】

レトロウイルスベクターを作製する場合、力価の高いウイルス産生細胞を各遺伝子を産生するレトロウイルスベクターごとに選択しているが、本発明の遺伝子置換方法により、一度マーカー遺伝子を発現するウイルス高産生細胞株を樹立しておけば、この細胞株染色体上のマーカー遺伝子を目的遺伝子と置換することにより、高産生株を容易に得ることができると考えられる。

【0065】

本発明の遺伝子置換方法による組換えウイルス作製の具体的な方法を、組換えアデノウイルスの作製を例として説明する。従来の技術での組換えアデノウイルスの作製方法は、アデノウイルスゲノム及び目的遺伝子を挿入したプラスミドベクターやコスミドベクター等で、293 細胞などの細胞を形質転換し、相同組換えにより生じた組換えウイルスをクローン化後、目的のウイルスを選別し増殖させる方法であり、これには長期間の作業が必要である。

【0066】

本発明の遺伝子置換方法による組換えウイルス作製によれば、効率の低い相同組換えを介さないため、短期間に目的の組換えウイルスを作製することができる

。すなわち、変異型FRT配列と野生型FRT配列とを挿入した遺伝子導入用のアデノウイルスをまず作製しておき、次いでこのウイルスを293細胞など組換えアデノウイルス作製に適した細胞に感染させ、同時に野生型FRT配列と変異型FRT配列との間に目的遺伝子を挿入したプラスミドDNAを該細胞に導入するとともにリコンビナーゼFLPを発現させることにより、変異型FRT配列と野生型FRT配列との間に目的遺伝子が挿入された組換えウイルスが高頻度に得られる。この場合、遺伝子導入用のアデノウイルスは、FLPによる組換えによりFRT配列には含まれたパッケージング配列が除去されるように作製し、プラスミドDNAから目的遺伝子と同時にパッケージング配列を加えて置換することにより、目的ウイルスが選択的に得られるようにするのが望ましい。リコンビナーゼFLPは、プラスミドDNAの形で導入してもよいし、またあらかじめ細胞を形質転換し、リコンビナーゼFLPを発現するようにしておいてもよい。

【0067】

リコンビナーゼFLPを発現する形質転換細胞の例としては、リコンビナーゼFLPを恒常的に発現する細胞や、ある条件でリコンビナーゼFLPの発現を誘導する細胞が挙げられる。後者の例としては、薬剤などの存在下あるいは非存在下でリコンビナーゼFLPの発現を誘導する細胞や、プロモーターとFLP遺伝子との間にリコンビナーゼの認識配列ースタッファー(stuffer)DNAーリコンビナーゼの認識配列を挿入した細胞にリコンビナーゼを作用させることによりリコンビナーゼFLPの発現を誘導する場合が挙げられる。

【0068】

リコンビナーゼ及びその認識配列の例としては、P1ファージ由来のリコンビナーゼCreとloxP配列が挙げられる。リコンビナーゼを作用させる方法としては、プラスミドDNAあるいはリポソームなどによる遺伝子導入あるいはリコンビナーゼタンパク質そのものを導入する方法や、アデノウイルスベクターなどウイルスベクターを用いる方法が挙げられるが、アデノウイルスベクターを用いる方法が望ましい。

【0069】

外来遺伝子Aが外来遺伝子Bに置換された組換えアデノウイルスを作製する場

合について説明する。遺伝子導入用の組換えアデノウイルスの構造の例として、アデノウイルス左端逆方向反復配列 (inverted terminal repeat: ITR)、野生型 F R T 配列、パッケージング配列、野生型 F R T 配列、遺伝子 A 及び変異型 F R T 配列の順に F R T 配列を挿入したアデノウイルスが挙げられる。ここで、野生型 F R T 配列／遺伝子 A の断片は E 1 欠失部位に挿入される。

【0070】

外来遺伝子 B 挿入用プラスミド DNA の例としては、野生型 F R T 配列、パッケージング配列、遺伝子 B 及び変異型 F R T 配列の構造を有するプラスミドが挙げられる。これらの遺伝子導入用のアデノウイルスと外来遺伝子 B 挿入用プラスミド DNA とを同時に或いは順次、リコンビナーゼ F L P を発現させるようにした 293 細胞などの細胞に導入すると、遺伝子導入用のアデノウイルスでは 2 つの野生型 F R T 配列に挟まれたパッケージング配列が除かれるとともに、野生型 F R T 配列、遺伝子 A 及び変異型 F R T 配列の部分がプラスミド由来の〔野生型 F R T 配列／パッケージング配列／遺伝子 B ／変異型 F R T 配列〕に置換された組換えアデノウイルスが生成する。遺伝子置換されなかった遺伝子導入用のアデノウイルスは、反応効率が高い 2 つの野生型 F R T 配列間の通常の「切り出し反応」によりパッケージング配列が除去されているため、ウイルス DNA は複製するもののウイルス粒子 (virion) 内に DNA がパッケージングされずウイルスとしては複製しない。一方、遺伝子置換されたアデノウイルスはパッケージング配列を有するため、ウイルスとして複製できるため、「遺伝子 B」に置換された組換えアデノウイルスが高頻度に得られる。

【0071】

遺伝子導入用のアデノウイルスの変異型 F R T 配列の挿入位置は、外来遺伝子 A の隣接部位であってもよいし、アデノウイルスゲノム上の遺伝子 A から離れた部位であってもよい。後者の挿入位置の例としては、L3 遺伝子と E2A 遺伝子との間の非翻訳領域、E3 遺伝子の欠失部位、E4 遺伝子の上流域と右端 ITR との間などが挙げられる。これらの位置に変異型 F R T 配列を挿入して遺伝子置換を行なう場合、生成するアデノウイルス DNA がウイルス粒子 (virion) に効率よくパッケージングされるように、目的遺伝子挿入用プラスミドの野生型 F R T 配列／変

異型 F R T 配列間の DNA のサイズを調節する必要があるが、遺伝子置換された組換えアデノウイルスはウイルスの複製に必須の遺伝子を欠失しているため、遺伝子治療用ベクターとして用いる場合、現在のアデノウイルスベクターで問題となっている副作用が軽減できると考えられる。

【0072】

以上の方法を、さらに具体的により詳細に説明する。まず、293 細胞などアデノウイルス E1A 遺伝子を発現し E1 遺伝子を欠失した非増殖型アデノウイルスの増殖に好適な細胞を、〔プロモーター／loxP 配列／薬剤耐性遺伝子／ポリ A 配列、loxP 配列／F L P 遺伝子／ポリ A 配列〕の構造を有する DNA で形質転換し、リコンビナーゼ Cre 依存に F L P を発現する細胞株（Cre 依存 F L P 発現細胞）を得る。ここで、薬剤耐性遺伝子は形質転換細胞株を選別するために必要であり、その例としてネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子などが挙げられる。また、プロモーターとしては、哺乳動物細胞で機能する限り特に限定されないが、その例として、CAG プロモーター（特開平 3-168087 号公報）、EF-1 α プロモーター（Gene, Vol.91, 217-223 (1990)）、SR α プロモーター（Molecular and Cellular Biology, Vol.8, 466-472 (1991)）等が挙げられる。さらに、リコンビナーゼ F L P 遺伝子の 5' 側または 3' 末端に核移行シグナル配列を接続させていてもよい。

【0073】

遺伝子導入用組換えアデノウイルスは、Cre 依存 F L P 発現細胞にリコンビナーゼ Cre を供給し F L P を発現させる役割を兼ね、左端 ITR とパッケージング配列との間に野生型 F R T 配列を挿入し、E1 欠失部位に野生型 F R T 配列とリコンビナーゼ Cre 発現単位（プロモーターとポリ A 配列を含む）をこの順になるよう挿入し、さらに L3 遺伝子と E2A 遺伝子との間の非翻訳領域、E3 遺伝子の欠失部位、E4 遺伝子の上流域と右端 ITR との間のいずれかの位置に変異型 F R T 配列を挿入しておく。以下の例では、E4 遺伝子の上流域と右端 ITR との間に変異型 F R T 配列を挿入した場合について説明する。左端 ITR とパッケージング配列との間の野生型 F R T 配列の挿入部位に特に制限はないが、ヒトアデノウイルス 5 型の塩基配列で 143 ～ 148 位に挿入するのが好ましい。プロモーターとしては、哺乳

動物細胞で機能する限り特に限定されないが、その例として、前述したCAG プロモーター、EF-1 α プロモーター、SR α プロモーター等が挙げられる。さらに、リコンビナーゼCre 遺伝子配列の5'側または3'側の末端に核移行シグナル配列を接続させていることが好ましい。これは、細胞質で合成されたりコンビナーゼCre がその認識配列であるloxP配列を有するDNAに効果的に作用するには、核内に移行する必要がある、核移行シグナル配列はこれを促進する (Daniel Kalderon ら、Cell. 39、499-509 (1984)) からである。核移行シグナル配列を有するCre 遺伝子は、プラスミドpSRNCRE (Kanegae Y. et al., Nucleic Acid Res., Vol.23, 3816-3821 (1995)) 等から得ることができる。

【0074】

外来遺伝子挿入用プラスミドの例としては、〔野生型FRT配列／パッケージング配列／遺伝子Bの発現単位／変異型FRT配列〕の構造を有するプラスミドが挙げられる。ここで野生型FRT配列とパッケージング配列との間のDNA配列に特に制限はないが、遺伝子導入用組換えアデノウイルスと同じDNA配列を有するのが望ましい。

【0075】

前述したCre 依存FLP発現細胞に遺伝子導入用組換えアデノウイルスを感染させるとともに、外来遺伝子挿入用プラスミドで形質転換すると、まず遺伝子導入用組換えアデノウイルスにより発現したCre タンパク質により、Cre 依存FLP発現細胞の2つのloxP配列の間の薬剤耐性遺伝子とポリA配列が除かれ、リコンビナーゼFLPが発現する。次いでリコンビナーゼFLPの作用により、Cre を発現する遺伝子導入用組換えアデノウイルスの2つの野生型FRT配列に挟まれたパッケージング配列が除かれるとともに、遺伝子導入用組換えアデノウイルスの野生型FRT配列と変異型FRT配列との間のCre 発現単位とアデノウイルスゲノムの大部分 (L1遺伝子からL5遺伝子まで) が、外来遺伝子挿入用プラスミドの〔野生型FRT配列／パッケージング配列／遺伝子Bの発現単位／変異型FRT配列〕と置換される。従って、遺伝子置換により生じたアデノウイルスは、〔左端ITR / FRT配列／パッケージング配列／遺伝子Bの発現単位／変異型FRT / 右端ITR〕の構造となり、アデノウイルスゲノムの大部分を欠失している

ため、このウイルス単独では増殖できない。一方、遺伝子置換しなかった遺伝子導入用組換えアデノウイルスは、パッケージング配列が除かれているため、そのゲノムDNAが複製しアデノウイルスの増殖に必須のタンパク質を産生するものの、そのゲノム自体は感染性ウイルス粒子にパッケージングされないため、ウイルス自体は増殖せずヘルパーウイルスとして作用する。その結果、遺伝子置換により生じたアデノウイルスは、このヘルパーウイルスが産生するアデノウイルスタンパク質によりそのゲノムDNAが複製するとともに、正常なパッケージング配列を有しているため感染性ウイルス粒子にパッケージングされウイルスとして選択的に増殖する。従って、この一連の反応で生じた組換えアデノウイルスの大部分は、遺伝子置換され、かつアデノウイルスゲノムの大部分を欠失した目的アデノウイルスであることが期待される。

【0076】

さらに前記f72により、酵母2ミクロンDNA由来の下記の野生型配列（配列番号：1）：

【0077】

【化7】

12345678

5'-GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAAGCTTC-3'

スパーサー領域

【0078】

において、スパーサー領域の7番目の塩基にGからCへの置換を有する2つの変異型FRT配列（配列番号：32）を用い、リコンビナーゼFLPの存在下に特異的DNA組換え反応を行なう方法が提供される。

【0079】

本発明の変異型FRT配列を含有したDNAは、医薬として遺伝子治療にも用いることができる。その方法を以下に説明する。

【0080】

まず、ヒト細胞の染色体に変異型FRT配列と野生型FRT配列とをあらかじめ

め挿入する。そのために、変異型 F R T 配列と野生型 F R T 配列とを有する D N A が医薬品として用いられる。該 D N A は、例えば、レトロウイルスやアデノ随伴ウイルス (AAV) などのウイルスベクター中に含まれる形で投与される。なかでも、レトロウイルスによる遺伝子導入は、染色体にランダムに挿入されるが、AAV では染色体の特定の部位 (第 19 番染色体の AAV-S1 領域) に挿入される確率が高いという観点から、AAV を使用することが好ましい。この染色体の特定部位への遺伝子導入には AAV がコードするウイルス遺伝子 (Rep) が必須であるが、現在用いられている AAV ベクターでは AAV 遺伝子の大部分が除かれているため、染色体への特異的組み込み機構は失われている。しかし、変異型 F R T 配列と野生型 F R T 配列とを合わせてもわずか 100 塩基足らずであるため、AAV の全ウイルス遺伝子を保持したまま、2 つの F R T 配列を挿入したウイルスを作製できる。その挿入位置は、AAV 遺伝子の両端に存在する逆方向反復配列 (inverted terminal repeat: ITR) の各々すぐ内側が望ましい。この 2 つの F R T 配列を挿入した AAV をヒトに投与することにより、染色体に 2 つの F R T 配列を挿入することができる。

【 0 0 8 1 】

次いで、野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間に目的遺伝子を挿入した環状 D N A 分子を含有した医薬と、リコンビナーゼ F L P タンパク質または F L P 遺伝子を保持した D N A を投与することにより、染色体上に存在する 2 つの F R T 配列の間に挟まれた AAV 遺伝子が除かれ、目的遺伝子に置換される。医薬としての環状 D N A 分子とリコンビナーゼ F L P もしくは F L P 遺伝子を保持した D N A 分子をヒト細胞に導入する方法としては、ウイルスベクターやリポソームベクターなど既存の遺伝子治療に用いられているベクターを用いる方法が挙げられる。

【 0 0 8 2 】

このようにして染色体に遺伝子が挿入されたヒト細胞では、目的遺伝子の両端に変異型 F R T 配列と野生型 F R T 配列が存在し、さらにその外側に AAV の ITR が存在するのみで、AAV の構造遺伝子は存在しないため、AAV 由来のタンパク質が発現し抗原となることもなく、目的遺伝子の発現が長期間安定に持続すること

が期待できる。また、挿入した遺伝子が不要になった場合、野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列の間に遺伝子が存在しない環状 DNA 分子を投与することにより、挿入した遺伝子を染色体から除くことができる。さらに、その後再び染色体への遺伝子の挿入が必要になった場合、2 つの F R T 配列が染色体上に残っているため、前述した方法で任意の遺伝子を挿入することができる。このように、本発明の変異型 F R T 配列をもつ DNA は、染色体への遺伝子を挿入及び除去が自由にできる遺伝子治療のための医薬品として用いることができる。

【0083】

また、基質特異性の異なる三つ以上の F R T 配列を用いることにより、遺伝子置換方法の応用範囲をさらに広げることが可能である。基質特異性の異なる三つの F R T 配列の組み合わせとして、例えば、野生型 F R T 配列と 2 つの変異型 F R T 配列、三つの変異型 F R T 配列等が挙げられる。本方法を、野生型 F R T 配列、変異型 F R T 配列 1、変異型 F R T 配列 2 の三つの異なる F R T 配列が同一 DNA 上に存在する場合を例として説明する。野生型 F R T 配列、遺伝子 A、変異型 F R T 配列 1、遺伝子 B 及び変異型 F R T 配列 2 をこの順に有する DNA (a) に、野生型 F R T 配列、遺伝子 C 及び変異型 F R T 配列 1 を有する環状 DNA (b) とをリコンビナーゼ F L P の存在下に反応させると、DNA (a) 中の遺伝子 A を遺伝子 C に置換することができる。一方、環状 DNA (b) の代わりに、変異型 F R T 配列 1、遺伝子 D 及び変異型 F R T 配列 2 をこの順で有する環状 DNA (c) とをリコンビナーゼ F L P の存在下に反応させると、DNA (a) 中の遺伝子 B を遺伝子 D に置換することができる。すなわち、異なる環状 DNA を用いるだけで、DNA (a) に存在する複数の遺伝子のうち目的の遺伝子のみを任意の遺伝子に置換することができる。

【0084】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではなく、本発明の技術分野における通常の変更ができることは言うまでもない。なお、実施例中のファージ、プラスミド、DNA、各種酵素、大腸菌、培養細胞等を取り扱う諸操作は、特に断らない限り、「

Molecular Cloning, A Laboratory Manual, T. Maniatis ら編、第 2 版 (1989), Cold Spring Harbor Laboratory」に記載の方法に準じて行なった。

【0085】

実施例 1

<リコンビナーゼ F L P を含む細胞抽出液の調製>

(1) リコンビナーゼ F L P 発現組換えアデノウイルスの作製

リコンビナーゼ F L P の翻訳開始コドンの前後の塩基配列を K o z a k 配列に合わせたプラスミドを得るため、以下の操作を行なった。

【0086】

(a) プラスミド p U C F L P は、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の 2 ミクロン DNA (6 3 1 8 b p : James et al., Nature, Vol. 286, 860-865 (1980)) の S p h I 部位 (5 5 6 8 番目) から X b a I 部位 (7 0 3 番目) までの F L P 遺伝子全長を含む断片 (1 4 5 7 b p) が、プラスミド p U C 1 9 の S p h I - X b a I 部位間に挿入されたプラスミドである。p U C F L P を X b a I および S p h I で消化し、F L P 遺伝子全長を含む約 1. 5 k b の断片を得た。

【0087】

(b) 5' 末端突出側が H i n d III 切断部位と、もう一方の末端が S p h I 切断部位と結合可能で、かつ翻訳開始コドンの上流に P s t I 部位を有する以下の配列の合成 DNA アダプターを調製した。

【0088】

5'-AG CTT CTG CAG CAG ACC GTG CAT CAT G-3' (配列番号 : 1 0)

3'-A GAC GTC GTC TGG CAC GTA-5' (配列番号 : 1 1)

【0089】

(a) および (b) の両 DNA を p U C 1 9 の H i n d III - X b a I 部位間に挿入し、プラスミド p U K F L P (4. 1 k b) を得た。

【0090】

p U K F L P を P s t I および F s p I で消化後平滑化した F L P コード領域を含む 1. 4 k b の断片を、コスミドベクター p A x C A w t のプロモーターとポリ A 配列との間の S w a I 部位に挿入し、コスミドベクター p A x C A F L P

を得た。

【0091】

pAxCALPとアデノウイルスDNA-末端タンパク質複合体とを既知の方法(Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93, 1320-1324 (1996) および特開平7-298877号公報)に従いリン酸カルシウム共沈法で293細胞を形質転換し、目的のFLP発現組換えアデノウイルスAxCALP(E1およびE3遺伝子欠失)を得た。

【0092】

(2) リコンビナーゼFLPを含む細胞抽出液の調製

リコンビナーゼFLP依存組換え反応に用いるFLPを含む細胞抽出液を得る目的で以下の操作を行なった。AxCALP(約 1×10^9 PFU)を、225cm²フラスコ1本の293細胞(ヒト胎児腎臓由来細胞株)に感染(37℃、1時間)させ、培地(5% FCS含有DMEM培地)を添加後さらに24時間培養した。培養終了後、低速遠心機で1000回転5分遠心し、培養上清を捨て細胞を集めた。細胞に保存用緩衝液(10% グリセロール/20mM トリス塩酸(pH7.5)/300mM 塩化ナトリウム/1mM EDTA(pH7.5))1mlを加え細胞を懸濁し、密閉型ソニケーターで200W、3分(30秒×6回)細胞を破碎し、細胞内に存在するリコンビナーゼFLPを放出させた。得られた細胞破碎液を高速遠心機で10,000回転20分遠心し、その上澄に最終濃度0.1mMとなるようPMSF(フェニルメチルスルフォニルフロライド)を加え冷凍保存(-80℃)した。

【0093】

実施例2

<変異型FRT配列を含む基質DNAの調製>

(1) 変異型FRT配列を含む合成DNAの作製

野生型FRT配列の8塩基のスペーサー部分を他の塩基に置換した変異型FRT配列を含む52塩基の合成DNAを作製した。また同時に野生型FRT配列を含む52塩基の合成DNAも作製した。野生型FRT配列の合成DNAの構造を図1(センス鎖は配列番号:12、アンチセンス鎖の配列番号:13)に、変異型FRT配列を含む9種類の合成DNAの配列(センス鎖及びアンチセンス鎖)及び

該野生型 F R T 配列の合成 D N A の配列を図 2 に示す。

【 0 0 9 4 】

野生型センス鎖とアンチセンス鎖は相補配列ではなく、各々の鎖をアニーリングし二本鎖 D N A とした際、5' 末端がそれぞれ 4 塩基突出し、各々の末端が制限酵素 XhoI 及び SpeI の消化断片になるように設計した。そのため、これらの二本鎖 D N A は、XhoI 断片側は制限酵素 XhoI 及び SalI 消化断片と、SpeI 断片側は制限酵素 SpeI 及び NheI 消化断片と結合できる。

【 0 0 9 5 】

全ての一本鎖合成 D N A は、5' 末端を T4 ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、それぞれの変異に対応するセンス鎖及びアンチセンス鎖をアニーリングした。以後、この二本鎖合成 D N A を変異型 F R T 合成 D N A と呼ぶ。

【 0 0 9 6 】

(2) 2 つの野生型 F R T 配列もしくは 2 つの同じ配列の変異型 F R T 配列を含む基質 D N A の調製

直鎖状 D N A の両端に同じ配列の変異型 F R T 配列を有する基質 D N A を得る目的で、以下の操作を行なった。

【 0 0 9 7 】

プラスミド pBR322 を制限酵素 NheI 及び SalI で同時に消化し、野生型 F R T または変異型 F R T 合成 D N A 9 種類をそれぞれライゲーション反応（プラスミド：合成 D N A のモル比 1 : 20）を行なった後、制限酵素 XhoI 及び SpeI で同時に消化した。この制限酵素消化により pBR322 D N A の両端に複数個結合した野生型もしくは変異型 F R T 合成 D N A が除かれ、pBR322 D N A の両端に野生型もしくは同じ配列の変異型 F R T 合成 D N A が各一ヶ所ずつ結合した約 4.1kb の直鎖状 D N A が生じる。次いでこれら反応物をアガロース電気泳動し、約 4.1kb のバンドをゲルから切り出した後 GEANCLEAN II (BI0101 社製) により精製した。この操作により、pBR322 D N A の両端に 2 つの野生型 F R T 配列もしくは 2 つの同じ配列の変異型 F R T 配列が結合した直鎖状 D N A 断片を得た。

【 0 0 9 8 】

この断片にアデノウイルス 5 型由来の D N A 断片を結合したプラスミドを構築

するため、以下の操作を行なった。

【0 0 9 9】

アデノウイルス 5 型の E1 及び E3 遺伝子以外のほぼ全長が挿入されたコスミドベクター pAxcw (特開平 8-308585 号公報 15 頁) を制限酵素 XbaI 及び XhoI で同時に消化し、生じた DNA 断片のうちの 3.8kb の断片 (アデノウイルス 5 型塩基配列 24,796 - 28,592 番目) を単離した。この 3.8kb の断片と、前述した pBR322 DNA の両端に同じ配列の F R T 合成 DNA が結合した DNA 断片とをリガーゼで結合すると、制限酵素 SpeI 断片と XbaI 断片とが結合した結果、環状化した。この DNA で大腸菌を形質転換し、2 つの野生型 F R T 配列もしくは 2 つの同じ配列の変異型 F R T 配列を有するプラスミド pBxxAxx (7.9kb、図 3) を得た。なお、pBxxAxx は同じ配列の 2 つの F R T 配列を有するプラスミドの総称で、例えば、F R T 配列が野生型の場合は pBfwtAfwt と、F3 の場合は pBF3AF3 と、f2161 の場合は pBf2161Af2161 と称する。

【0 1 0 0】

pBfwtAfwt ならびに変異型 F R T 配列を含む 9 種類のプラスミドを制限酵素 DraI で消化し、次に示す F L P 依存 DNA 組換え反応の基質 DNA として用いた。

【0 1 0 1】

実施例 3

< 2 つの同じ配列の変異型 F R T 配列間での F L P 依存 DNA 組換え反応 >

以下に示すアッセイ方法で、2 つの変異型 F R T 配列間で F L P 依存組換え反応が起きるかどうかを検討した。終濃度、50mM トリス塩酸 (pH7.5) / 10mM MgCl₂ / 5mM DTT を含む緩衝液に、実施例 2 で調製した DraI 消化済みプラスミド DNA (1.5 μg) と実施例 1 で調製した F L P を含む細胞抽出液 25 μl を加え (反応液量 50 μl)、30℃ で 30 分反応した。反応終了後、反応液に 200 μl の滅菌水及び 50 μl の 20mM EDTA 溶液 (pH8.0) を加え、フェノール/クロロホルム抽出ならびにクロロホルム抽出を行ない、さらにエタノール沈殿し、得られた DNA を RNaseA (20 μg/ml) を含む TE バッファー (pH8.0) 20 μl に溶解した。次いで、その全量を制限酵素 NcoI 消化し、アガロースゲル電気泳動後、臭化エチジウ

ム (EtBr) 染色により検出された DNA のバンドを解析した。

【0 1 0 2】

基質 DNA には制限酵素 NcoI サイトが 1ヶ所のみ存在するので、FLP による組換え反応を行わない DraI 消化済みの基質 DNA (7.2kb と 0.7kb) を制限酵素 NcoI 消化すると、5.9kb、1.3kb に 0.7kb を加えた 3 本のバンドが生じる。一方、基質 DNA が FLP により組換え反応を起こすと、変異型 FRT を 1 個有する約 3.8kb の環状 DNA と変異型 FRT を 1 個有する約 3.4kb の直鎖状 DNA が生じるので、これらを制限酵素 NcoI 消化すると、前記 3.8kb 及び 3.4kb のバンドに 0.7kb のバンドを加えた 3 本のバンドが生じる (図 4 参照)。従って、3.8kb 及び 3.4kb のバンドは FLP による組換え反応が起きたことを示し、5.9kb 及び 1.3kb のバンドは FLP による組換え反応が起きていないことを示すので、これらのバンドの量比により組換え反応の効率が分かる。

【0 1 0 3】

なお、反応効率を数値化するため、3.8kb 及び 3.4kb のバンドの DNA 量の合計に対する反応系の全 DNA 量の比を、2 つの FRT 配列間の組換え率 (%) として算出した。

【0 1 0 4】

本測定方法における野生型 FRT 配列間の組換え率は 4.8% で、先行技術である F3 の変異型 FRT 配列間の組換え率は 3.1% と、野生型 FRT 配列より明らかに低い値であった。それに比べ、f2161 の組換え率は 4.5%、f2262 の組換え率は 3.8% と、いずれも F3 よりも高い組換え率を示した。また、f2151 は 2.9%、f61 は 2.6% と F3 よりやや低い組換え率であり、f2272 と f2273 のそれぞれの組換え率は 0 であった。さらに、公知配列 f72 の組換え率は 10.9% であり野生型の 2 倍以上であった。

【0 1 0 5】

以上の結果より、本発明の f2161 および f2262 の変異型 FRT 配列は、先行技術である F3 の変異型 FRT 配列よりも組換え効率の点で優れており、また、f2151 と f61 は F3 とほぼ同程度の反応効率であることが示された。

【0 1 0 6】

実施例 4

<野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間での F L P 依存 D N A 組換え反応>

(1) 野生型 F R T 配列を 1 つ有するプラスミド (pBRFRT) の構築

プラスミド pBR322 に野生型 F R T 配列が 1 つ挿入されたプラスミド (pBRFRT) を構築するため、以下の (a) 及び (b) の操作を行なう。

【0107】

(a) プラスミド pBR322 の制限酵素 NheI サイトから EcoNI サイト間の約 0.4kb の断片を、XhoI リンカーを用いて野生型 loxP 配列を含む D N A に置換したプラスミド pBRwt (Lee, G. et al., Gene Vol.14, 55-65 (1998)) を制限酵素 XhoI で消化する。この断片と実施例 2 - (1) で作製した野生型 F R T 配列を含む 52 塩基の合成 D N A とをライゲーション後、制限酵素 SpeI 及び PstI で同時に消化し、pBR322 D N A の両端に複数個結合した野生型 F R T 合成 D N A を除く。次いで反応物をアガロース電気泳動し、約 3kb のバンドをゲルから切り出し、野生型 F R T を 1 つ含む約 3.0kb の断片を得る。

【0108】

(b) プラスミド pBR322 を制限酵素 PstI 及び NheI で同時に消化後、アガロース電気泳動し、生じた 2 本の D N A バンドのうち約 1.0kb の断片を回収する。

【0109】

(a) 及び (b) で調製した両 D N A をライゲーションし、pBR322 の NheI サイトと EcoNI サイトとの間に野生型 F R T 配列が 1 つ挿入されたプラスミド pBRFRT (4.4kb、図 5) を得る。

【0110】

(2) 野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列とを含むプラスミドの構築ならびに基質 D N A の調製

プラスミド pBRFRT の野生型 F R T 配列から約 30bp 離れた位置に SalI サイトが存在するので、pBRFRT を制限酵素 SalI で消化し直鎖状にした後、実施例 2 - (1) で作製した変異型 F R T 配列を含む 52 塩基の合成 D N A (9 種類) を各々ライゲーションする。この操作により pBRFRT の SalI 消化部位に変異型 F R T 合成 D N A

のXhoI消化断片側が結合する。次いで、反応液を制限酵素SpeII 及びXhoIで同時に消化し、pBRFRTの両端に複数個結合する変異型FRT合成DNAを除いた後、未反応及び制限酵素消化された変異型FRT合成DNAをGEANCLEAN II (BIO101社製)により反応液から除き、片方の端に野生型FRT配列が、他方の端に変異型FRT配列が各1つ結合した直鎖状DNA(約4.1kb)を得る。

【0111】

この断片と実施例2-(2)で調製したアデノウイルス5型ゲノムを制限酵素XhoIとXbaIとで同時に消化した約3.8kbとをライゲーションし、プラスミドpBfwtAxx(7.9kb、図6)を得る。なお、プラスミドpBfwtAxxは上記方法により構築した一連のプラスミドの総称で、実際には図2に示した変異型FRT配列と野生型FRT配列とを各1つずつ有する個々のプラスミドのことである。

【0112】

プラスミドpBfwtAxxを制限酵素DraIで消化し、次に示すFLP依存DNA組換え反応の基質DNAとして用いる。

【0113】

(3) 野生型FRT配列と変異型FRT配列との間でのFLP依存DNA組換え反応

前述した基質DNAを実施例3で示した反応液に加え、30℃で30分FLP依存組換え反応を行なう。反応終了後のDNAを精製し、制限酵素NcoI消化後アガロースゲル電気泳動を行ない、EtBr染色により検出されるDNAのバンドを解析する。

【0114】

基質DNAには、制限酵素NcoIサイトが1か所のみ存在するので、FLPによる組換え反応を行なわないDraI消化済みの基質DNA(7.2kbと0.7kb)を制限酵素NcoI消化すると、5.9kb断片、1.3kb断片に0.7kbを加えた3本のバンドが生じる。一方、基質DNAがFLPにより組換え反応を起こすと、FRT配列を1個有する約3.8kbの環状DNAとFRT配列を1個有する約3.4kbの直鎖状DNAが生じるので、これらを制限酵素NcoI消化すると3.8kb、3.4kbに0.7kbを加えた3本のバンドが生じる(図7参照)。従って、3.8kb及び3.4kbのバンドはF

LPによる組換え反応が起きたことを示し、5.9kb 及び1.3kb のバンドはFLPによる組換え反応が置き換えていないことを示すので、これらのバンドの量比により組換え効率が示される。

【0115】

配列表フリーテキスト

配列番号：10は、合成DNAアダプターの配列である。

【0116】

配列番号：11は、合成DNAアダプターの配列である。

【0117】

配列番号：12は、野生型FRT配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0118】

配列番号：13は、野生型FRT配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0119】

配列番号：14は、変異型FRT配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0120】

配列番号：15は、変異型FRT配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0121】

配列番号：16は、変異型FRT配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0122】

配列番号：17は、変異型FRT配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0123】

配列番号：18は、変異型FRT配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【 0 1 2 4 】

配列番号：1 9 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【 0 1 2 5 】

配列番号：2 0 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【 0 1 2 6 】

配列番号：2 1 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【 0 1 2 7 】

配列番号：2 2 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【 0 1 2 8 】

配列番号：2 4 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【 0 1 2 9 】

配列番号：2 5 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【 0 1 3 0 】

配列番号：2 6 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【 0 1 3 1 】

配列番号：2 7 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【 0 1 3 2 】

配列番号：2 8 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【 0 1 3 3 】

配列番号：2 9 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチド

の配列である。

【0 1 3 4】

配列番号：3 0 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 3 5】

配列番号：3 1 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 3 6】

配列番号：3 2 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 3 7】

【発明の効果】

本発明の変異型 F R T 配列を含有してなる DNA によれば、リコンビナーゼ F L P の存在下、野生型 F R T 配列とは組換え反応が起きないが、同一配列の 2 つの変異型 F R T 配列での組換え反応が起こるという優れた効果を奏する。さらに本発明により、野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列、もしくは異なる配列の変異型 F R T 配列の組み合わせにより、動物細胞をはじめとする高等真核細胞で、効率の高い遺伝子置換方法が提供される。

【0 1 3 8】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.

<120> DNA comprising mutant FRT sequence

<130> SP-11-005

<160> 32

【 0 1 3 9 】

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

gaagttccta tactttctag agaataggaa cttc

34

【 0 1 4 0 】

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

gaagttccta tactctctgg agaataggaa cttc

34

【 0 1 4 1 】

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3

gaagttccta tactctccag agaataggaa cttc

34

【 0 1 4 2 】

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 4

gaagttccta tactatcttg agaataggaa cttc

34

【 0 1 4 3 】

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 5

gaagttccta tactttctgg agaataggaa cttc

34

【 0 1 4 4 】

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 6

gaagttccta tactatttga agaataggaa cttc

34

【 0 1 4 5 】

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 7

gaagttccta taccttgtga agaataggaa cttc

34

【 0 1 4 6 】

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 8

gaagttccta tactatctac agaataggaa cttc

34

【 0 1 4 7 】

<210> 9

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 9

gaagttccta tactgtctat agaataggaa cttc

34

【 0 1 4 8 】

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The oligonucleotide is synthesized DNA adaptor.

<400> 10

agcttctgca gcagaccgtg catcatg

27

【 0 1 4 9 】

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The oligonucleotide is synthesized DNA adaptor.

<400> 11

atgcacggtc tgctgcaga

19

【 0 1 5 0 】

<210> 12

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on wild type FRT sequence.

<400> 12

tcgaggacgt cgaagttcct atactttcta gagaatagga acttctccgg aa

52

【 0 1 5 1 】

<210> 13

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on wild type FRT sequence.

<400> 13

ctagttccgg agaagttcct attctctaga aagtatagga acttcgacgt cc 52

【0 1 5 2】

<210> 14

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 14

tcgaggacgt cgaagttcct atactatcta gagaatagga acttctccgg aa 52

【0 1 5 3】

<210> 15

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 15

tcgaggacgt cgaagttcct atactttctg gagaatagga acttctccgg aa 52

【0 1 5 4】

<210> 16

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 16

tcgaggacgt cgaagttcct atactttcta cagaatagga acttctccgg aa 52

【 0 1 5 5 】

<210> 17

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 17

tcgaggacgt cgaagttcct atactatttg aagaatagga acttctccgg aa 52

【 0 1 5 6 】

<210> 18

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 18

tcgaggacgt cgaagttcct atactctctg gagaatagga acttctccgg aa 52

【 0 1 5 7 】

<210> 19

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 19

tcgaggacgt cgaagttcct atactatcta cagaatagga acttctccgg aa 52

【 0 1 5 8 】

<210> 20

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 20

tcgaggacgt cgaagttcct atactctcca gagaatagga acttctccgg aa 52

【 0 1 5 9 】

<210> 21

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 21

tcgaggacgt cgaagttcct atactatctt gagaatagga acttctccgg aa 52

【 0 1 6 0 】

<210> 22

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 22

tcgaggacgt cgaagttcct atactgtcta tagaatagga acttctccgg aa 52

【 0 1 6 1 】

<210> 23

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 23

ctagttccgg agaagttcct attctctaga tagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 6 2 】

<210> 24

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 24

ctagttccgg agaagttcct attctccaga aagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 6 3 】

<210> 25

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 25

ctagttccgg agaagttcct attctgtaga aagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 6 4 】

<210> 26

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 26

ctagttccgg agaagttcct attcttcaaa tagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 6 5 】

<210> 27

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 27

ctagttccgg agaagttcct attctccaga gagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 6 6 】

<210> 28

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 28

ctagttccgg agaagttcct attctgtaga tagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 6 7 】

<210> 29

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 29

ctagttccgg agaagttcct attctctgga gagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 6 8 】

<210> 30

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 30

ctagttccgg agaagttcct attctcaaga tagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 6 9 】

<210> 31

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 31

ctagttccgg agaagttcct attctataga cagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 7 0 】

<210> 32

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 32

gaagttccta tactttctac agaataggaa cttc

34

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、野生型 F R T 配列の合成 DNA の構造を示す図である。(s) はセンス鎖(配列番号: 1 2)を、(a) はアンチセンス鎖(配列番号: 1 3)を示す。

【図 2】

図 2 は、変異型 F R T 配列を含む合成した DNA の配列を示す。下線は、野生型から置換した塩基を示す。

【図 3】

図 3 は、プラスミド pBxxAxx の構造を示す模式図である。太線部分はアデノウイルス由来であり、細線部分は pBR322 由来である。「M」は変異型 F R T 配列を意味し、文字上の矢印は F R T 配列の向きを示す。Ap^R はアンピシリン耐性遺伝子、ori は大腸菌の複製開始起点を示す。

【図 4】

図 4 は 2 つの同じ配列の変異型 F R T 間でのリコンビナーゼ F L P 依存組換え反応の測定法の原理を示す模式図である。太線部分はアデノウイルス由来であり、細線部分は pBR322 由来である。

【図 5】

図 5 は、プラスミド pBRFRT の構造を示す模式図である。「F」は野生型 F R T 配列を意味し、文字上の矢印は F R T 配列の向きを示す。Ap^R はアンピシリン耐性

遺伝子、ori は大腸菌の複製複製開始起点を示す。

【図 6】

図 6 は、プラスミド pBfwAxx の構造を示す模式図である。太線部分はアデノウイルス由来であり、細線部分は pBR322 由来である。「F」は野生型 F R T 配列を、「M」は変異型 F R T 配列を意味し、文字上の矢印は F R T 配列の向きを示す。Ap^R はアンピシリン耐性遺伝子、ori は大腸菌の複製開始起点を示す。

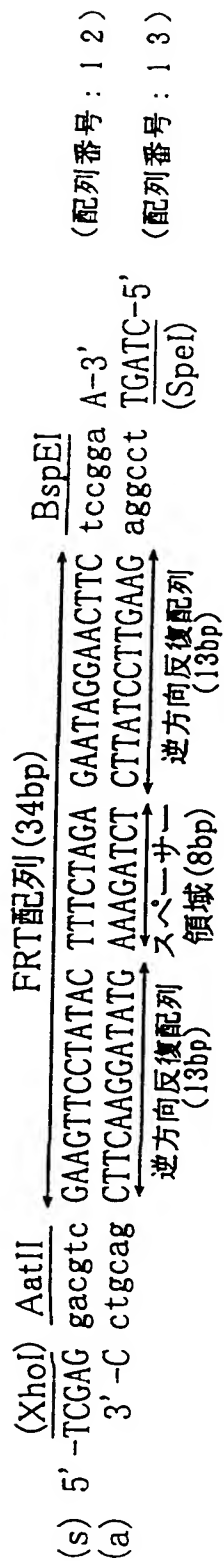
【図 7】

図 7 は野生型 F R T 配列と変異型 F R T との間でのリコンビナーゼ F L P 依存組換え反応の測定法の原理を示す模式図である。「F」及び白抜きの箱は野生型 F R T 配列を、「M」及び黒塗りの箱は変異型 F R T 配列を意味し、文字上の矢印は F R T 配列の向きを示す。また、太線部分はアデノウイルス由来であり、細線部分は pBR322 由来である。

【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】

センス鎖

123456 78

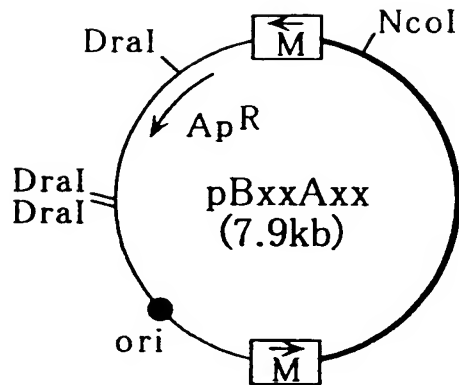
wtPRTs	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACTTTCTA	GAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 1 2)
f22s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACATCTA	GAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 1 4)
f61s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACTTTCTG	GAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 1 5)
f72s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACTTTCTA	GAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 1 6)
F3s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACATTTG	GAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 1 7)
f2161s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACTTCTG	GAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 1 8)
f2272s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACATCTA	GAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 1 9)
f2151s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACTTCTCA	GAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 2 0)
f2262s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACATCTT	GAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 2 1)
f2373s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACTTCTA	GAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 2 2)

アンチセンス鎖

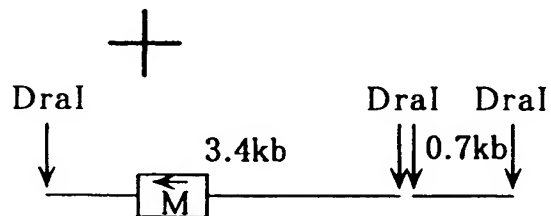
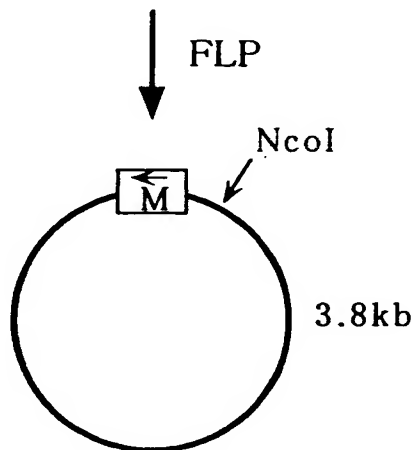
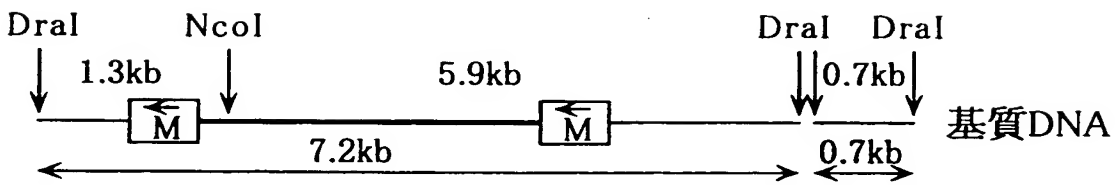
876543 21

wtPRTa	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTCCT	ATTCTCTAGA	AAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 1 3)
f22a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTCCT	ATTCTCTAGA	TAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 2 3)
f61a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTCCT	ATTCTCCAGA	AAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 2 4)
f72a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTCCT	ATTCTGTAGA	AAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 2 5)
F3a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTCCT	ATTCTTCAA	TAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 2 6)
f2161a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTCCT	ATTCTTCA	GAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 2 7)
f2272a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTCCT	ATTCTGTAGA	TAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 2 8)
f2151a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTCCT	ATTCTCTGA	GAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 2 9)
f2262a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTCCT	ATTCTCAAGA	TAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 3 0)
f2373a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTCCT	ATTCTATAGA	TAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 3 1)

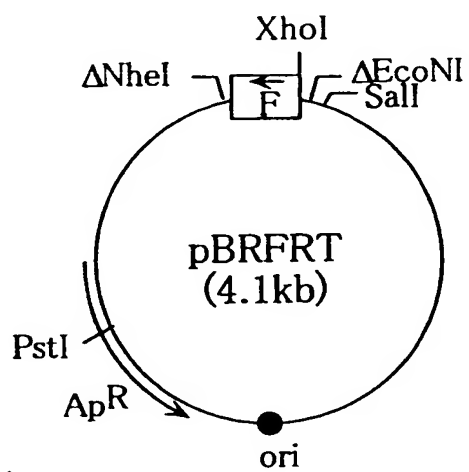
【図 3】



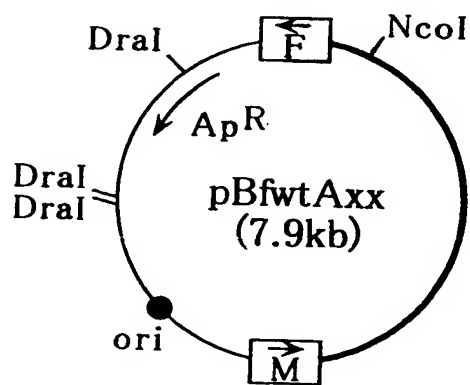
【図 4】



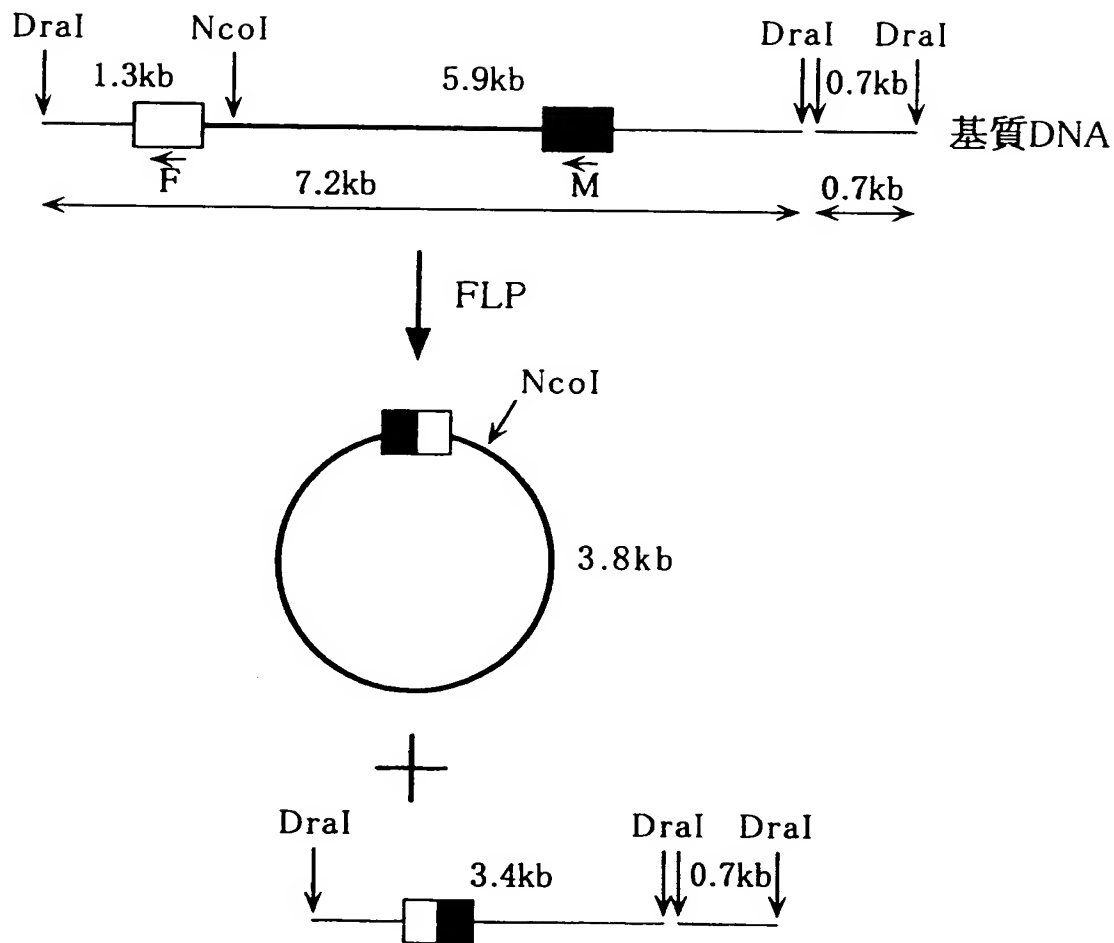
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

リコンビナーゼ F L P の存在下、野生型 F R T 配列とは組換え反応が起きないが、同一配列の 2 つの変異型 F R T 配列間で組換え反応が起こる変異型 F R T 配列を含有した D N A ; 並びに効率の高い遺伝子挿入若しくは遺伝子置換を行う方法等を提供すること。

【解決手段】

変異型 F R T 配列（それぞれ配列番号：2 ～ 5）を含有した D N A ; 該配列のスペーサー領域を除く領域において少なくとも 1 個の塩基の置換を有し、（A）リコンビナーゼ F L P の存在下で野生型 F R T 配列との間で特異的 D N A 組換え反応が起こらず（B）リコンビナーゼ F L P の存在下、同一の配列を有するもう 1 つの変異型 F R T 配列との間で特異的 D N A 組換え反応が起こる変異型 F R T 配列を含有した D N A ; 該 D N A により形質転換された細胞；該 D N A をリコンビナーゼ F L P の存在下に用いる遺伝子置換法、該 D N A を染色体上に有したトランスジェニック動物；該 D N A を含有した医薬；並びに 2 つの変異型 F R T 配列（配列番号：3 2）を用い、リコンビナーゼ F L P の存在下に特異的 D N A 組換え反応を行う方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000183370]

1. 変更年月日	1990年 8月 9日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号
氏 名	住友製薬株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [599139006]

1. 変更年月日 1999年 9月30日

 [変更理由] 新規登録

 住 所 東京都渋谷区代々木2丁目37番15-412号

 氏 名 斎藤 泉

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

28.09.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1 9 9 9 年 1 2 月 6 日

REC'D 17 NOV 2000

出 願 番 号
Application Number:

平成 1 1 年 特 許 願 第 3 4 6 7 2 7 号

WIPO PCT

出 願 人
Applicant (s):

斎藤 泉
住友製薬株式会社

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 0 年 1 1 月 6 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造

出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 0 - 3 0 9 0 0 2 8

【書類名】 特許願
 【整理番号】 SP-11-006
 【提出日】 平成11年12月 6日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 C12N 15/11

A61K 48/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区代々木2丁目37番15-412号

【氏名】 斎藤 泉

【発明者】

【住所又は居所】 東京都品川区西五反田8丁目10番14-1405号

【氏名】 鐘ヶ江 裕美

【特許出願人】

【識別番号】 599139006

【氏名又は名称】 斎藤 泉

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100095832

【弁理士】

【氏名又は名称】 細田 芳徳

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第280210号

【出願日】 平成11年 9月30日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 050739

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9200192

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 変異型 F R T 配列を含有してなる D N A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 酵母 2 ミクロン D N A 由来の下記の野生型 F R T 配列（配列番号：1）：

【化 1】

12345678

5'-GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAACTTC-3'

スパーサー領域

において、中央部の 8 塩基（スパーサー領域）の塩基が下記（1）～（4）：

（1）T C T C T G G A （f 2 1 6 1）

（2）T C T C C A G A （f 2 1 5 1）

（3）T A T C T T G A （f 2 2 6 2）及び

（4）T T T C T G G A （f 6 1）

からなる群より選ばれた配列の塩基に置換された配列を有する変異型 F R T 配列（それぞれ配列番号：2～5）を含有してなる D N A。

【請求項 2】 請求項 1 に規定された変異型 F R T 配列において、スパーサー領域を除く領域において少なくとも 1 個の塩基の置換をさらに有する配列からなり、下記（A）及び（B）の性質を有する変異型 F R T 配列を含有してなる D N A：

（A）リコンビナーゼ F L P の存在下でも野生型 F R T 配列との間で特異的 D N A 組換え反応が起こらない、及び

（B）リコンビナーゼ F L P の存在下、同一の配列を有するもう 1 つの変異型 F R T 配列との間で特異的 D N A 組換え反応が起こる。

【請求項 3】 リコンビナーゼ F L P の存在下でも、異なる配列を有するもう 1 つの変異型 F R T 配列との特異的 D N A 組換え反応が起こらない、請求項 1 又は 2 記載の変異型 F R T 配列を含有してなる D N A。

【請求項 4】 少なくとも 1 つの野生型 F R T 配列と少なくとも 1 つの請求

項 1 ～ 3 いずれかに規定された変異型 F R T 配列とを含有してなる D N A。

【請求項 5】 野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間に所望の遺伝子を有してなる請求項 4 記載の D N A。

【請求項 6】 互いに異なる配列をもつ少なくとも 2 つの請求項 3 に規定された変異型 F R T 配列を含有してなる D N A。

【請求項 7】 互いに異なる配列をもつ 2 つの変異型 F R T 配列の間に所望の遺伝子を有してなる請求項 6 記載の D N A。

【請求項 8】 請求項 4 ～ 7 いずれか記載の D N A により形質転換された細胞。

【請求項 9】 下記の D N A (a) 及び D N A (b) をリコンビナーゼ F L P の存在下に反応させ、下記の D N A (c) を得ることを特徴とする遺伝子置換方法：

D N A (a) ：野生型 F R T 配列、遺伝子 A 及び請求項 1 ～ 3 いずれか記載の変異型 F R T 配列をこの順に有する D N A ；

D N A (b) ：野生型 F R T 配列、遺伝子 B 及び D N A (a) と同じ変異型 F R T 配列をこの順に有する D N A ；

D N A (c) ： D N A (a) において、遺伝子 A が遺伝子 B に置換された D N A ；

ここで、遺伝子 A 及び遺伝子 B は互いに異なる任意の遺伝子である。

【請求項 1 0】 下記の D N A (d) 及び D N A (e) をリコンビナーゼ F L P の存在下に反応させ、下記の D N A (f) を得ることを特徴とする遺伝子置換方法：

D N A (d) ：互いに異なる配列をもつ 2 つの請求項 3 に規定された変異型 F R T 配列（それぞれ変異型 F R T 配列 1 及び変異型 F R T 配列 2 という）及び遺伝子 A を変異型 F R T 配列 1、遺伝子 A 及び変異型 F R T 配列 2 の順に有する D N A ；

D N A (e) ：変異型 F R T 配列 1、遺伝子 B 及び変異型 F R T 配列 2 をこの順に有する D N A ；

D N A (f) ： D N A (d) において、遺伝子 A が遺伝子 B に置換された D N A

;

ここで、遺伝子 A 及び遺伝子 B は互いに異なる任意の遺伝子である。

【請求項 1 1】 遺伝子 B が機能的な遺伝子ではないことを特徴とする、請求項 9 又は 1 0 記載の方法。

【請求項 1 2】 遺伝子 A が機能的な遺伝子ではないことを特徴とする、請求項 9 又は 1 0 記載の方法。

【請求項 1 3】 DNA (a) 若しくは DNA (d) が細胞の染色体 DNA であり、DNA (b) 若しくは DNA (e) がプラスミド DNA 又は二本鎖環状 DNA ウイルスである、請求項 9 ～ 1 2 いずれか記載の方法。

【請求項 1 4】 DNA (a) 若しくは DNA (d) が細胞の染色体 DNA であり、DNA (b) 若しくは DNA (e) が細胞内で変換されることにより二本鎖環状 DNA となる性質を有する、請求項 9 ～ 1 2 いずれか記載の方法。

【請求項 1 5】 DNA (a) 若しくは DNA (d) が二本鎖 DNA ウイルスの染色体 DNA であり、DNA (b) 若しくは DNA (e) がプラスミド DNA 又は二本鎖環状 DNA ウイルスである、請求項 9 ～ 1 2 いずれか記載の方法。

【請求項 1 6】 DNA (a) 若しくは DNA (d) が二本鎖 DNA ウイルスの染色体 DNA であり、DNA (b) 若しくは DNA (e) が細胞内で変換されることにより二本鎖環状 DNA となる性質を有する、請求項 9 ～ 1 2 いずれか記載の方法。

【請求項 1 7】 二本鎖 DNA ウイルスがアデノウイルスである、請求項 1 5 又は 1 6 記載の方法。

【請求項 1 8】 請求項 4 ～ 7 いずれか記載の DNA を染色体上に有してなるトランスジェニック動物。

【請求項 1 9】 請求項 4 ～ 7 いずれか記載の DNA を含有してなる医薬。

【請求項 2 0】 酵母 2 ミクロン DNA 由来の下記の野生型 F R T 配列（配列番号：1）：

【化 2】

12345678

5' -GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAACTTC-3'

スパーサー領域

において、スパーサー領域の 7 番目の塩基に G から C への置換を有する 2 つの変異型 F R T 配列（配列番号：3 2）を用い、リコンビナーゼ F L P の存在下に特異的 D N A 組換え反応を行なう方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、変異型 F R T 配列を含有した D N A とその応用に関する。さらに詳しくは、野生型 F R T 配列とは特異的組換え反応は起こさないが変異型同士では特異的組換え反応を起こす変異型 F R T 配列と、該変異型 F R T 配列を用いた遺伝子置換方法並びに特異的 D N A 組換え方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の 2 ミクロン D N A によりコードされるリコンビナーゼ F L P は、F R T 配列と呼ばれる 34 塩基の特定の D N A 配列を認識し、2 つの F R T 配列間で D N A 鎖の切断、鎖の交換と結合の全行程を行なう部位特異的な D N A 組換え酵素である (Babineau et al., J. Biol. Chem., Vol. 260, 12313-12319 (1985))。同一 D N A 分子上に同方向の 2 つの F R T 配列が存在する場合は、リコンビナーゼ F L P によりその間に挟まれた D N A 配列が切り出されて環状分子となり（切り出し反応）、またその逆に、異なる D N A 分子上に 2 つの F R T 配列が存在し、その一方が環状 D N A である場合は、F R T 配列を介して環状 D N A が他方の D N A 分子上に挿入される（挿入反応）。

【0 0 0 3】

挿入反応と切り出し反応は可逆的であるが、挿入反応により同一 D N A 分子上に 2 つの F R T 配列が存在すると、ただちに切り出し反応も起こるため、反応の

平衡は切り出し反応側に偏っている。従って、挿入反応により任意のDNAを他のDNA分子上に挿入できる頻度は極めて低いことが知られている。

【0004】

FRT配列は34塩基のDNA配列からなり (Jayaram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 82. 5875-5879 (1985))、2つの13塩基の逆方向反復配列 (inverted repeat) に挟まれた8塩基の配列はスペーサー領域と呼ばれ、DNA鎖の組換えはスペーサー領域で行われることが知られている (Umlauf SW. et al., EMBO Journal, Vol.7. 1845-1852 (1988)、Lee J. et al., EMBO Journal, Vol.18. 784-791, 1999)。FRT配列 (配列番号: 1) を示す。

【0005】

【化3】

12345678

5'-GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAACTTC-3'

スペーサー領域

【0006】

このスペーサー領域の塩基を本来のFRT配列 (野生型FRT配列) とは異なる塩基に変える (変異型FRT配列) ことにより、野生型FRT配列との間では特異的DNA組換え反応が起きないが、2つの変異型FRT配列間では特異的DNA組換え反応が起きることが発見された (Schlake T. et al., Biochemistry, Vol.33. 12746-12751 (1994))。さらに、この変異型FRT配列を用い、動物由来培養細胞において、リコンビナーゼFLPの存在下に異なる2つのDNA分子に存在する遺伝子を置換できることが示された。すなわち、あるDNA分子の変異型FRT配列と野生型FRT配列との間に存在する遺伝子Aを、他のDNA分子上に存在する変異型FRT配列と野生型FRT配列との間に存在する遺伝子Bと置換できることが示された (Schlake T. et al., Biochemistry, Vol.33. 12746-12751 (1994)、Seibler J. et al., Biochemistry, Vol.36. 1740-1747 (1997))。

【0007】

F R T 配列のスペーサー領域に変異を導入した既存の変異型 F R T 配列として、TATTGAA (F3という) をスペーサー領域に有する配列 (配列番号: 6) が知られている (前述 Seibler J. ら)。Seibler らは、この変異型 F R T 配列 (F3) と野生型 F R T 配列とを用い、動物細胞染色体での遺伝子置換を行なったが、置換前後の遺伝子に薬剤耐性遺伝子を用い、薬剤選択により遺伝子置換された細胞の濃縮を行なったにもかかわらず、遺伝子置換効率は 21-38 % に過ぎなかった (Seibler J. et al., Biochemistry, Vol.37, 6229-6234 (1998))。薬剤選択を行わなければ、この遺伝子置換効率はさらに低下すると考えられる。すなわち、先行技術の F3 の変異は、効率の良い遺伝子置換反応を行なうには不十分な配列であり、より効率の良い変異型 F R T 配列が求められている。

【0008】

また、CTTGTA (F5 という) のスペーサー領域を有する変異型 F R T 配列 (配列番号: 7) を用いた遺伝子置換の効率も実用には不十分である。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、リコンビナーゼ F L P の存在下、野生型 F R T 配列とは組換え反応が起きないが、同一配列の 2 つの変異型 F R T 配列間では組換え反応が起こる変異型 F R T 配列を含有した DNA を提供することにある。さらに本発明の目的は、野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列又は異なる配列の変異型 F R T 配列との組み合わせにより、動物細胞をはじめとする高等真核細胞で、効率の高い遺伝子挿入もしくは遺伝子置換を行なう方法を提供し、その方法を動植物細胞への遺伝子導入、組換えウイルス作製、動植物個体での遺伝子操作などに応用することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、目的の変異型 F R T 配列を検索するため、F L P 依存 DNA 組換え反応の効率を測定する非常に鋭敏かつ直接的な in vitro の試験方法の開発に成功した。この試験法を用い、F R T 配列のスペーサー領域を他の塩基に置換した新たな変異型 F R T 配列の DNA 組換え反応の効率を測定することにより、野

生型 F R T 配列とは組換え反応が起きないが、同一配列の 2 つの変異型 F R T 配列間での組換え反応が起こる新たな変異型 F R T 配列を発見することに成功した。

【 0 0 1 1 】

すなわち、本発明は、

〔 1 〕 酵母 2 ミクロン DNA 由来の下記の野生型 F R T 配列（配列番号： 1 ）

:

【 0 0 1 2 】

【 化 4 】

12345678

5' -GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAAGCTTC-3'

スパーサー領域

【 0 0 1 3 】

において、中央部の 8 塩基（スパーサー領域）の塩基が下記（ 1 ）～（ 4 ）：

（ 1 ） T C T C T G G A （ f 2 1 6 1 ）

（ 2 ） T C T C C A G A （ f 2 1 5 1 ）

（ 3 ） T A T C T T G A （ f 2 2 6 2 ） 及び

（ 4 ） T T T C T G G A （ f 6 1 ）

からなる群より選ばれた配列の塩基に置換された配列を有する変異型 F R T 配列（それぞれ配列番号： 2 ～ 5 ）を含有してなる DNA、

〔 2 〕 前記〔 1 〕に規定された変異型 F R T 配列において、スパーサー領域を除く領域において少なくとも 1 個の塩基の置換をさらに有する配列からなり、下記（ A ）及び（ B ）の性質を有する変異型 F R T 配列を含有してなる DNA：

（ A ）リコンビナーゼ F L P の存在下でも野生型 F R T 配列との間で特異的 DNA 組換え反応が起こらない、及び

（ B ）リコンビナーゼ F L P の存在下、同一の配列を有するもう 1 つの変異型 F R T 配列との間で特異的 DNA 組換え反応が起こる、

〔 3 〕 リコンビナーゼ F L P の存在下でも、異なる配列を有するもう 1 つの変

異型 F R T 配列との特異的 D N A 組換え反応が起こらない、前記〔1〕又は〔2〕記載の変異型 F R T 配列を含有してなる D N A、

〔4〕 少なくとも 1 つの野生型 F R T 配列と少なくとも 1 つの前記〔1〕～〔3〕いずれかに規定された変異型 F R T 配列とを含有してなる D N A、

〔5〕 野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間に所望の遺伝子を有してなる前記〔4〕記載の D N A、

〔6〕 互いに異なる配列をもつ少なくとも 2 つの前記〔3〕に規定された変異型 F R T 配列を含有してなる D N A、

〔7〕 互いに異なる配列をもつ 2 つの変異型 F R T 配列の間に所望の遺伝子を有してなる前記〔6〕記載の D N A、

〔8〕 前記〔4〕～〔7〕いずれか記載の D N A により形質転換された細胞、

〔9〕 下記の D N A (a) 及び D N A (b) をリコンビナーゼ F L P の存在下に反応させ、下記の D N A (c) を得ることを特徴とする遺伝子置換方法：

D N A (a)：野生型 F R T 配列、遺伝子 A 及び前記〔1〕～〔3〕いずれか記載の変異型 F R T 配列をこの順に有する D N A；

D N A (b)：野生型 F R T 配列、遺伝子 B 及び D N A (a) と同じ変異型 F R T 配列をこの順に有する D N A；

D N A (c)：D N A (a) において、遺伝子 A が遺伝子 B に置換された D N A；

ここで、遺伝子 A 及び遺伝子 B は互いに異なる任意の遺伝子である、

〔10〕 下記の D N A (d) 及び D N A (e) をリコンビナーゼ F L P の存在下に反応させ、下記の D N A (f) を得ることを特徴とする遺伝子置換方法：

D N A (d)：互いに異なる配列をもつ 2 つの前記〔3〕に規定された変異型 F R T 配列（それぞれ変異型 F R T 配列 1 及び変異型 F R T 配列 2 という）及び遺伝子 A を変異型 F R T 配列 1、遺伝子 A 及び変異型 F R T 配列 2 の順に有する D N A；

D N A (e)：変異型 F R T 配列 1、遺伝子 B 及び変異型 F R T 配列 2 をこの順に有する D N A；

D N A (f)：D N A (d) において、遺伝子 A が遺伝子 B に置換された D N A

;

ここで、遺伝子A及び遺伝子Bは互いに異なる任意の遺伝子である、

〔11〕 遺伝子Bが機能的な遺伝子ではないことを特徴とする、前記〔9〕又は〔10〕記載の方法、

〔12〕 遺伝子Aが機能的な遺伝子ではないことを特徴とする、前記〔9〕又は〔10〕記載の方法、

〔13〕 DNA (a) 若しくはDNA (d) が細胞の染色体DNAであり、DNA (b) 若しくはDNA (e) がプラスミドDNA又は二本鎖環状DNAウイルスである、前記〔9〕～〔12〕いずれか記載の方法、

〔14〕 DNA (a) 若しくはDNA (d) が細胞の染色体DNAであり、DNA (b) 若しくはDNA (e) が細胞内で変換されることにより二本鎖環状DNAとなる性質を有する、前記〔9〕～〔12〕いずれか記載の方法、

〔15〕 DNA (a) 若しくはDNA (d) が二本鎖DNAウイルスの染色体DNAであり、DNA (b) 若しくはDNA (e) がプラスミドDNA又は二本鎖環状DNAウイルスである、前記〔9〕～〔12〕いずれか記載の方法、

〔16〕 DNA (a) 若しくはDNA (d) が二本鎖DNAウイルスの染色体DNAであり、DNA (b) 若しくはDNA (c) が細胞内で変換されることにより二本鎖環状DNAとなる性質を有する、前記〔9〕～〔12〕いずれか記載の方法、

〔17〕 二本鎖DNAウイルスがアデノウイルスである、前記〔15〕又は〔16〕記載の方法、

〔18〕 前記〔4〕～〔7〕いずれか記載のDNAを染色体上に有してなるトランスジェニック動物、

〔19〕 前記〔4〕～〔7〕いずれか記載のDNAを含有してなる医薬、並びに

〔20〕 酵母2ミクロンDNA由来の下記の野生型FRT配列（配列番号：1）：

【0014】

【化 5】

12345678

5'-GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAACTTC-3'

スパーサー領域

【0 0 1 5】

において、スパーサー領域の 7 番目の塩基に G から C への置換を有する 2 つの変異型 F R T 配列（配列番号：3 2）を用い、リコンビナーゼ F L P の存在下に特異的 DNA 組換え反応を行なう方法、
 に関する。

【0 0 1 6】

【発明の実施の形態】

本発明の変異型 F R T 配列を含有した DNA は、酵母 2 ミクロン DNA 由来の下記の野生型 F R T 配列（配列番号：1）：

【0 0 1 7】

【化 6】

12345678

5'-GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAACTTC-3'

スパーサー領域

【0 0 1 8】

において、中央部の 8 塩基（スパーサー領域）の塩基が下記（1）～（4）：

(1) T C T C T G G A (f 2 1 6 1)

(2) T C T C C A G A (f 2 1 5 1)

(3) T A T C T T G A (f 2 2 6 2) 及び

(4) T T T C T G G A (f 6 1)

からなる群より選ばれた配列の塩基に置換された配列を有する変異型 F R T 配列（それぞれ、配列番号：2～5）を含有した DNA である。本発明の DNA は、前記（1）～（4）からなる群より選ばれた配列を含有するため、リコンビナー

ゼ F L P の存在下、野生型 F R T 配列とは組換え反応が起きないが、同一配列の 2 つの変異型 F R T 配列間では組換え反応が起こるという優れた性質を発現する。また、本発明の D N A によれば、より高い遺伝子置換効率で遺伝子置換を行なうことができる。

【 0 0 1 9 】

本発明において、「リコンビナーゼ F L P」とは、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の 2 ミクロン D N A によりコードされ、2 つの F L P の認識配列 (F R T 配列) 間の部位特異的組換え反応を行なう酵素をいう (Babineau et al., J. Biol. Chem., Vol. 260, 12313-12319 (1985))。リコンビナーゼ F L P により、同一方向に配置された 2 つの F R T 配列に挟まれた領域を切り出すことが可能である。

【 0 0 2 0 】

本発明において、「F R T 配列」とは、配列番号 : 1 に示される 34 塩基からなる D N A 配列 (Jayaram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 82, 5875-5879 (1985)) をいう。「スペーサー領域」とは、前記 F R T 配列中の 2 つの逆方向反復配列 (13bp) に挟まれた 8 塩基の D N A 配列をいう。本明細書においては、この 34 塩基からなる F R T 配列を特に「野生型 F R T 配列」と称する。

【 0 0 2 1 】

本発明において、「変異型 F R T 配列」とは、上記野生型 F R T 配列の少なくとも 1 つの塩基が他の塩基に置換された D N A 配列をいう。本発明において、「スペーサー領域を置換した変異型 F R T 配列」とは、野生型 F R T 配列の 8 塩基のスペーサー領域のうち少なくとも 1 つの塩基が他の塩基に置換された D N A 配列をいう。

【 0 0 2 2 】

本発明の変異型 F R T 配列を含有した D N A は、前述した変異型 F R T 配列のうち、野生型 F R T 配列とは F L P 依存 D N A 組換え反応が起こらないが、同一配列の 2 つの変異型 F R T 配列間での組換え反応が起こる変異型 F R T 配列を含有した D N A である。従って、スペーサー領域だけでなく逆方向反復配列部の塩基がさらに置換されている変異型 F R T 配列であっても、上記性質を満たす限り

は本発明の変異型 F R T 配列に含まれる。

【 0 0 2 3 】

すなわち、本発明の変異型 F R T 配列を含有した D N A には、変異型 F R T 配列において、スパーサー領域を除く領域において少なくとも 1 個の塩基の置換をさらに有する配列からなり、下記 (A) 及び (B) の性質：

(A) リコンビナーゼ F L P の存在下でも野生型 F R T 配列との間で特異的 D N A 組換え反応が起こらない、及び

(B) リコンビナーゼ F L P の存在下、同一の配列を有するもう 1 つの変異型 F R T 配列との間で特異的 D N A 組換え反応が起こる、
を有する変異型 F R T 配列を含有した D N A も含まれる。

【 0 0 2 4 】

かかる D N A には、リコンビナーゼ F L P の存在下でも、異なる配列を有するもう 1 つの変異型 F R T 配列との特異的 D N A 組換え反応が起こらないという性質を有する配列を含有した D N A も含まれる。

【 0 0 2 5 】

なお、本明細書においては、「野生型 F R T 配列」と「変異型 F R T 配列」とを包括的に、単に「F R T 配列」と称する場合がある。

【 0 0 2 6 】

本明細書において、「リコンビナーゼ F L P の存在下での特異的 D N A 組換え反応」と「F L P 依存 D N A 組換え反応」とは同じ意味であり、リコンビナーゼ F L P の存在する条件下に、2 つの F R T 配列を含有した D N A の間で起こる、D N A 鎖の切断、D N A 鎖の交換と結合の全行程の反応のことをいう。

【 0 0 2 7 】

本発明の変異型 F R T 配列を含有した D N A としては、例えば、少なくとも 1 つの野生型 F R T 配列と少なくとも 1 つの前記変異型 F R T 配列とを含有した D N A 並びに互いに異なる配列をもつ少なくとも 2 つの前記変異型 F R T 配列を含有した D N A 等が挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

【 0 0 2 8 】

かかる D N A を用いて、2 つの F R T 配列の間、すなわち F R T 配列と F R T

配列との間に所望の遺伝子を有するDNAを作製し、得られたDNAを遺伝子置換法に用いることができる。かかるDNAも本発明に含まれる。具体的には、野生型FRT配列と変異型FRT配列との間に所望の遺伝子を有したDNA、互いに異なる2つの変異型FRT配列の間に所望の遺伝子を有したDNAが挙げられる。

【0029】

前記「所望の遺伝子」は、特に制限はなく、タンパク質をコードする遺伝子や、プロモーターやポリA配列などの構造遺伝子、あるいはリンカー等の機能を有しない遺伝子であってもよい。

【0030】

本明細書において、「遺伝子置換」とは、異なる2つのDNA分子上に存在する遺伝子を入れ換えることをいう。リコンビナーゼFLPの存在下に、野生型FRT配列と変異型FRT配列とを用いて遺伝子置換を行なう方法の概念は、既存の文献（Schlake T. et al., Biochemistry, Vol.33, 12746-12751 (1994)）に開示されている。

【0031】

本発明の変異型FRT配列を含有したDNAを用いた遺伝子置換法のDNA組換え反応効率は、本発明者らが開発した非常に鋭敏かつ直接的なin vitroのFLP依存DNA組換え反応効率の測定方法により測定することができる。

【0032】

本測定方法の概略は、適当な長さのDNAに2つのFRT配列を挿入した基質DNAをリコンビナーゼFLP存在下に一定時間反応後、適当な制限酵素で消化し、電気泳動により分離したDNAバンドのサイズから反応効率を測定するものである。反応前の基質DNAバンドの量と組換え反応により生じたDNAバンドの量が直接比較できるため、DNA組換え反応効率を定量的に測定できる。すでに本発明者らは、同様の原理で他のリコンビナーゼであるP1ファージ由来のCre依存DNA組換え反応の効率を測定する方法を確立している（Lee, G. et al., Gene Vol.14, 55-65 (1998)）。以下に本測定方法を詳しく説明する。

【0033】

まず、野生型 F R T 配列及びそのスパーサー領域を他の塩基に置換した変異型 F R T 配列を有する D N A を合成する。当該 D N A を合成する方法としては、P C R 法、部位特異的変異法など特に制限はないが、D N A 合成機等を用いて化学的に相補的な一本鎖 D N A を合成し、その後相補鎖をアニーリングし二本鎖 D N A として用いるのが望ましい。F R T 配列を有する D N A は、34塩基の F R T 配列を含んでいれば特に制限はないが、F R T 配列以外に制限酵素の認識配列を含むことが望ましい。

【 0 0 3 4 】

次に、野生型又は変異型 F R T 配列を有する上記 D N A を、適当な長さの D N A 断片、例えばプラスミド p B R 3 2 2 を制限酵素消化して直鎖状にした D N A 断片の両端に連結し、両端に 2 つの野生型 F R T 配列もしくは、2 つの同じ配列の変異型 F R T 配列を有する直鎖状 D N A 断片を調製する。次いで、この D N A 断片に適当な長さの D N A 断片、例えば、アデノウイルス由来の D N A 断片を連結したプラスミドを作製し、これを制限酵素消化して直鎖状の基質 D N A を調製する。また、野生型 F R T 配列を 1 つ有するプラスミドから、同様の方法により、野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列とを有する直鎖状の基質 D N A を調製する。

【 0 0 3 5 】

リコンビナーゼ F L P を含む酵素溶液の調製法は特に制限はなく、リコンビナーゼ F L P を発現するように工夫された酵母、大腸菌等や、培養細胞などから調製できるが、リコンビナーゼ F L P を発現する組換えアデノウイルスを感染させた培養細胞の抽出液を用いることが好ましい。その理由は、組換えアデノウイルス感染細胞では、目的のタンパク質を大量に発現するからである。

【 0 0 3 6 】

以上の基質 D N A とリコンビナーゼ F L P を含む酵素溶液とを一定時間反応させた後、反応液を適当な制限酵素で消化し、アガロース電気泳動で生じた D N A バンドを解析する。この測定方法では、未反応の基質 D N A 、組換え反応により生じた D N A 、及び組換え反応の中間体 D N A の量を直接比較できるため、2 つの同じ配列の変異型 F R T 配列間、及び野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間での組換え反応の効率を定量的にかつ高感度に測定できる。

【 0 0 3 7 】

本発明者らは、F R T 配列のスペーサー領域の 2 番目の塩基の変異と 5 ～ 7 番目の塩基の変異の組合せが特に重要との仮説を立て、f2161（配列番号：2）、f2151（配列番号：3）、f2262（配列番号：4）、f2272（配列番号：8）、f2373（配列番号：9）の 5 種類の変異型 F R T 配列を考案した。さらに、2 塩基置換との比較のため、1 塩基のみ置換した f61 変異型 F R T 配列（配列番号：5）も考案した。

【 0 0 3 8 】

次いで、前記 6 種類の変異型 F R T 配列に関して、同じ配列を有する 2 つの変異型 F R T 配列間での組換え反応の効率を、前記測定系で測定する。なお比較のため、先行技術の変異である F3 並びにその他の 1 塩基置換の 2 種類の変異型 F R T 配列（図 2 参照）についても測定した。

【 0 0 3 9 】

先行技術である F3 の配列を有する変異型 F R T 配列の組換え効率は、野生型 F R T 配列の約 65% であり、十分な組換え効率でないことが示された。一方、本発明の f2161 と f2262 の変異型 F R T 配列は、F3 よりも高い組換え効率を示し、f2151 と f61 それぞれの組換え効率は、F3 とほぼ同じかやや低いものの実用上十分に使用可能な効率であった。すなわち、f2161、f2262、f2151 及び f6 の各変異型 F R T 配列は、本発明の目的を達しうる変異型 F R T 配列である。また、配列公知の f72（配列番号：32）は、予想外の結果を示し、野生型 F R T 配列の 2 倍以上の組換え効率を示した。すなわち、f72 は、野生型 F R T 配列よりも効率の高い、F L P 依存 DNA 組換え反応の基質として用いることができる。

【 0 0 4 0 】

さらに、野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列間での組換え反応の効率を同様に測定することにより、野生型 F R T 配列とは特異的組換え反応は起こさないが変異型同士では特異的組換え反応を起こす変異型 F R T 配列を目的の変異型 F R T 配列として選択することができる。

【 0 0 4 1 】

本発明の変異型 F R T 配列を含有した DNA により、遺伝子置換効率に優れた

遺伝子置換方法が可能になる。かかる遺伝子置換方法も本発明に含まれる。

【0042】

本発明の遺伝子置換方法としては、下記のDNA (a) 及びDNA (b) をリコンビナーゼFLPの存在下に反応させ、下記のDNA (c) を得ることを特徴とする遺伝子置換方法（以下、「遺伝子置換方法1」という場合がある）：

DNA (a)：野生型FRT配列、遺伝子A及び本発明の変異型FRT配列をこの順に有するDNA；

DNA (b)：野生型FRT配列、遺伝子B及びDNA (a) と同じ変異型FRT配列をこの順に有するDNA；

DNA (c)：DNA (a) において、遺伝子Aが遺伝子Bに置換されたDNA；

並びに

下記のDNA (d) 及びDNA (e) をリコンビナーゼFLPの存在下に反応させ、下記のDNA (f) を得ることを特徴とする遺伝子置換方法（以下、「遺伝子置換方法2」という場合がある）：

DNA (d)：互いに異なる配列をもつ2つの本発明の変異型FRT配列（それぞれ変異型FRT配列1及び変異型FRT配列2という）及び遺伝子Aを変異型FRT配列1、遺伝子A及び変異型FRT配列2の順に有するDNA；

DNA (e)：変異型FRT配列1、遺伝子B及び変異型FRT配列2をこの順に有するDNA；

DNA (f)：DNA (d) において、遺伝子Aが遺伝子Bに置換されたDNA；

が挙げられる。ここで、遺伝子A及び遺伝子Bは互いに異なる任意の遺伝子である。また、遺伝子A及び遺伝子Bは、それぞれ、機能的な遺伝子ではないものでもよい。

【0043】

本明細書において、「機能的な遺伝子でない」とは、構造遺伝子の既知の機能又は制御機能をもたないDNA配列であることを意味する。かかる例示としては、リンカー等が挙げられる。

【 0 0 4 4 】

本発明の遺伝子置換方法の具体例として、遺伝子置換方法 1（野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列とを用いた方法）について説明するが、遺伝子置換方法 2（変異型 F R T 配列 1 と変異型 F R T 配列 2 とを用いた方法）の場合も同様である。また、動物細胞の染色体の遺伝子を置換する場合を例として説明するが、本方法は動物細胞の染色体に限らず、動物ウイルスのゲノムや、植物細胞、酵母又は細菌等の微生物の染色体や、バクテリオファージなどにも適用できる。

【 0 0 4 5 】

まず、動物細胞の染色体にあらかじめ野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列とを挿入しておく。野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間には任意の遺伝子 A が存在してよく、この場合は遺伝子置換となる。一方、遺伝子 A が存在しない場合には、遺伝子挿入となる。

【 0 0 4 6 】

一方、野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列とを挿入した環状 D N A 分子内の 2 つの F R T 配列の間に、導入しようとする遺伝子 B を挿入しておく（野生型 F R T 配列／遺伝子 B ／変異型 F R T 配列と称す）。

【 0 0 4 7 】

この「環状 D N A 分子」は、例えば、プラスミド D N A や二本鎖環状 D N A ウイルスのようにあらかじめ環状である分子であってもよく、また常法により細胞内に導入後、細胞内で変換されることにより二本鎖環状 D N A となる性質を有する分子であってもよい。

【 0 0 4 8 】

前記野生型 F R T 配列／遺伝子 B ／変異型 F R T 配列を含む環状 D N A 分子を公知の方法により前述した細胞内に導入し、同時に公知の方法によりリコンビナーゼ F L P を細胞内で発現させることにより、環状 D N A 分子上の遺伝子 B が細胞の染色体上の野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間に挿入される。その際、細胞の染色体上の 2 つの F R T 配列の間に遺伝子 A が存在する場合は、この遺伝子 A が除かれ遺伝子 B が挿入される遺伝子置換となる。染色体上の 2 つの F R T 配列の間に遺伝子が存在しない場合には遺伝子挿入となる。さらに、環状 D

N A の 2 つの F R T 配列の間に遺伝子が存在しない場合は、染色体上の遺伝子 A を除くこと（遺伝子欠失）ができる。また、遺伝子 A を除いても染色体上には 2 つの F R T 配列は存在するので、2 つの F R T 配列の間に任意の遺伝子 C を有する別の環状 D N A 分子を用いることにより、再びこの染色体上の 2 つの F R T 配列間に遺伝子を導入することができる。前記遺伝子挿入及び遺伝子欠失も本発明の遺伝子置換法の範囲に含まれる。

【 0 0 4 9 】

細胞に D N A 分子を導入する方法としては、一般的に用いられている方法を使用することができる。その例として、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAE-dextran 法、リポフェクション法、遺伝子銃等の物理化学的方法、環状 D N A ウイルス等の生物学的方法等が挙げられる。

【 0 0 5 0 】

環状 D N A ウイルスとしては、用いる細胞の種類により異なるが、例えば、パピローマウイルスや SV40 などが挙げられる。

【 0 0 5 1 】

細胞内に導入後、環状分子とする方法の例としては、リコンビナーゼを用いる方法が挙げられ、リコンビナーゼとしては、バクテリオファージ P 1 由来のリコンビナーゼ Cre (Sternberg et al., J. Mol. Biol. Vol.150, 467-486 (1981))、チゴサッカロマイセス・ルーイの pSR1 プラスミド由来の R (Matsuzaki et al., Mol. Cell. Biol. Vol.8, 955-962 (1988))、リコンビナーゼ F L P などが挙げられる。

【 0 0 5 2 】

細胞中の染色体にあらかじめ 2 つの F R T 配列を挿入する場合、例えば、2 つの F R T 配列が存在するプラスミド D N A 等を用いて細胞を形質転換すればよい。

【 0 0 5 3 】

形質転換時の遺伝子導入方法としては、前述した物理化学的方法が挙げられる。さらに、レトロウイルスやアデノ随伴ウイルス、HIV 等の、ウイルスゲノムを細胞の染色体に挿入する性質を有するウイルスを用いてもよい。

【0054】

動物細胞内でリコンビナーゼFLPを発現させる方法としては、リコンビナーゼFLPの遺伝子を保持したDNAやRNAを細胞に導入後、細胞内でリコンビナーゼFLPを発現させる方法（リコンビナーゼFLP遺伝子導入法）、リコンビナーゼFLPタンパク質そのものを細胞内に導入する方法（リコンビナーゼFLPタンパク質導入法）等が挙げられる。

【0055】

リコンビナーゼFLP遺伝子導入法の例としては、FLPの遺伝子を保持したDNAやRNAを前述した物理化学的方法で細胞に導入する方法や、ウイルスベクターを用いる方法が挙げられる。ウイルスベクターとしては、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、EBウイルスなどが挙げられるが、その遺伝子導入効率の高さからアデノウイルスが好適である。

【0056】

本発明の変異型FRT配列を含有したDNAを用いた細胞染色体上での遺伝子置換法の利点は、その効率の高さと染色体の特定の部位に遺伝子を挿入できることである。特に、染色体の特定部への遺伝子導入は、形質転換細胞を取得する上では極めて重要である。

【0057】

その理由は、DNAを用いた通常の形質転換法（相同組換え以外の方法）や、レトロウイルスやアデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターを用いた従来の方法では、染色体上での目的遺伝子の挿入部位はランダムであるため、挿入部位により目的遺伝子の発現量及びその染色体での安定性に大きな差がある。したがって、例えば、目的遺伝子を安定に（長期間）、かつ高レベルでの発現が可能な形質転換細胞株を得るには、非常に多くの細胞株をスクリーニングする必要がある、しかも、1遺伝子ごとに、すなわち1回の形質転換ごとに、このスクリーニングを繰り返さなければならないという煩雑な操作を要する。それに対し、本発明による遺伝子置換方法によれば、2つのFRT配列に挟まれたある遺伝子の発現を指標にして、その発現量が高く安定な細胞株を一旦取得すれば、任意のどの遺伝子を導入しても、遺伝子の発現が高く安定な細胞株を容易に取得することがで

きる。しかも、その効率は極めて高いため、通常必要な薬剤選択の操作が必要なく、細胞のクローン化の操作だけで目的の細胞株を短期間に取得することができる。対象とする細胞株に特に制限はないが、トランスジェニック動物の作製に用いるES細胞などの形質転換には、特に有効である。

【0058】

本発明には、前記変異型FRT配列を含有したDNAにより形質転換された細胞も含まれる。

【0059】

本発明の遺伝子置換方法は、培養細胞だけでなく動物個体に対しても適用される。特定の外来遺伝子を動物個体で発現させる方法として、トランスジェニック動物の技術がある。しかしながら、通常の方法でトランスジェニック動物を作製するには、まず目的遺伝子を発現するES細胞等を作製し、次いでこのES細胞等を仮親の腹で発生させ、生まれた子どもについて目的遺伝子の発現を指標にスクリーニングし、さらに目的遺伝子を発現している動物個体をかけ合わせて初めて多数のトランスジェニック動物が得られるという複雑な操作が必要である。したがって目的の遺伝子を発現するトランスジェニック動物の作製には非常に時間がかかるという欠点を有する。通常これらの操作には半年から1年を要する。

【0060】

本発明の遺伝子置換法を用いた場合、一旦遺伝子導入用のトランスジェニック動物を作製すれば、個々の遺伝子に応じたトランスジェニック動物の作製は不要となる。遺伝子導入用のトランスジェニック動物とは、染色体に変異型FRT配列と野生型FRT配列とを挿入した動物で、その作製は従来のトランスジェニック動物作製と同様の方法で行ない、薬剤による選択のため2つのFRT配列の間にネオマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子を挿入してもおいてもよい。かかる遺伝子導入用動物に、DNA(a)：野生型FRT配列と変異型FRT配列との間に目的遺伝子を挿入したDNA、すなわち、野生型FRT配列、遺伝子A及び前記変異型FRT配列をこの順に有する環状DNAとリコンビナーゼFLPとを導入することにより、DNA(a)とリコンビナーゼFLPの両者が導入された組織や細胞で目的遺伝子が染色体に挿入され、その遺伝子を発現させることが

できる。動物個体へのDNA (a) とリコンビナーゼFLPとの導入は、リポソーム法やウイルスベクター、遺伝子銃など既存の方法で十分に行なうことができる。

【0061】

本発明の方法を用いれば、異なる遺伝子を導入する場合でも、遺伝子に応じたDNA (a) を用いるだけでよく、非常に時間のかかるトランスジェニック動物の作製を行なう必要がない。本発明は、前記変異型FRT配列を含有したDNAを染色体上に有したトランスジェニック動物をも包含する。本発明のトランスジェニック動物は、本発明の変異型FRT配列を含有したDNAを染色体上に有しているため、種々の遺伝子の導入に汎用できるという優れた性質を有する。

【0062】

さらに、DNA (a) とリコンビナーゼFLPとの両者を局所的に導入するだけで、目的の臓器や組織にのみ目的遺伝子を挿入することもできる。

【0063】

本発明の遺伝子置換方法は、組換えウイルスの作製にも用いることができる。ウイルスとしてDNAウイルスが挙げられ、DNAウイルスとして、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、EBウイルス、サイトメガロウイルス等のヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、カナリアポックスウイルス等のポックスウイルス、昆虫のバキュロウイルス等が挙げられる。また、ウイルスとしてRNAウイルスが挙げられ、特にレトロウイルスの作製に好適である。

【0064】

レトロウイルスベクターを作製する場合、力価の高いウイルス産生細胞を各遺伝子を産生するレトロウイルスベクターごとに選択しているが、本発明の遺伝子置換方法により、一度マーカー遺伝子を発現するウイルス高産生細胞株を樹立しておけば、この細胞株染色体上のマーカー遺伝子を目的遺伝子と置換することにより、高産生株を容易に得ることができると考えられる。

【0065】

本発明の遺伝子置換方法による組換えウイルス作製の具体的な方法を、組換えアデノウイルスの作製を例として説明する。従来の技術での組換えアデノウイル

スの作製方法は、アデノウイルスゲノム及び目的遺伝子を挿入したプラスミドベクターやコスミドベクター等で、293 細胞などの細胞を形質転換し、相同組換えにより生じた組換えウイルスをクローン化後、目的のウイルスを選別し増殖させる方法であり、これには長期間の作業が必要である。

【0066】

本発明の遺伝子置換方法による組換えウイルス作製によれば、効率の低い相同組換えを介さないため、短期間に目的の組換えウイルスを作製することができる。すなわち、変異型 F R T 配列と野生型 F R T 配列とを挿入した遺伝子導入用のアデノウイルスをまず作製しておき、次いでこのウイルスを293 細胞など組換えアデノウイルス作製に適した細胞に感染させ、同時に野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間に目的遺伝子を挿入したプラスミド DNA を該細胞に導入するとともにリコンビナーゼ F L P を発現させることにより、変異型 F R T 配列と野生型 F R T 配列との間に目的遺伝子が挿入された組換えウイルスが高頻度に得られる。この場合、遺伝子導入用のアデノウイルスは、F L P による組換えにより F R T 配列には含まれたパッケージング配列が除去されるように作製し、プラスミド DNA から目的遺伝子と同時にパッケージング配列を加えて置換することにより、目的ウイルスが選択的に得られるようにするのが望ましい。リコンビナーゼ F L P は、プラスミド DNA の形で導入してもよいし、またあらかじめ細胞を形質転換し、リコンビナーゼ F L P を発現するようにしておいてもよい。

【0067】

リコンビナーゼ F L P を発現する形質転換細胞の例としては、リコンビナーゼ F L P を恒常的に発現する細胞や、ある条件でリコンビナーゼ F L P の発現を誘導する細胞が挙げられる。後者の例としては、薬剤などの存在下あるいは非存在下でリコンビナーゼ F L P の発現を誘導する細胞や、プロモーターと F L P 遺伝子との間にリコンビナーゼの認識配列—スタッファー(stuffer) DNA—リコンビナーゼの認識配列を挿入した細胞にリコンビナーゼを作用させることによりリコンビナーゼ F L P の発現を誘導する場合が挙げられる。

【0068】

リコンビナーゼ及びその認識配列の例としては、P1ファージ由来のリコンビナ

ーゼCre と loxP 配列が挙げられる。リコンビナーゼを作用させる方法としては、プラスミド DNA、リポソームなどを用いる遺伝子導入あるいはリコンビナーゼタンパク質そのものを導入する方法や、アデノウイルスベクターなどウイルスベクターを用いる方法が挙げられるが、アデノウイルスベクターを用いる方法が望ましい。

【0069】

外来遺伝子 A が外来遺伝子 B に置換された組換えアデノウイルスを作製する場合について説明する。遺伝子導入用の組換えアデノウイルスの構造の例として、アデノウイルス左端逆方向反復配列 (inverted terminal repeat: ITR)、野生型 F R T 配列、パッケージング配列、野生型 F R T 配列、遺伝子 A 及び変異型 F R T 配列の順に F R T 配列を挿入したアデノウイルスが挙げられる。ここで、野生型 F R T 配列／遺伝子 A の断片は E 1 欠失部位に挿入される。

【0070】

外来遺伝子 B 挿入用プラスミド DNA の例としては、野生型 F R T 配列、パッケージング配列、遺伝子 B 及び変異型 F R T 配列の構造を有するプラスミドが挙げられる。これらの遺伝子導入用のアデノウイルスと外来遺伝子 B 挿入用プラスミド DNA とを同時に或いは順次、リコンビナーゼ F L P を発現させるようにした 293 細胞などの細胞に導入すると、遺伝子導入用のアデノウイルスでは 2 つの野生型 F R T 配列に挟まれたパッケージング配列が除かれるとともに、野生型 F R T 配列、遺伝子 A 及び変異型 F R T 配列の部分がプラスミド由来の〔野生型 F R T 配列／パッケージング配列／遺伝子 B ／変異型 F R T 配列〕に置換された組換えアデノウイルスが生成する。遺伝子置換されなかった遺伝子導入用のアデノウイルスは、反応効率が高い 2 つの野生型 F R T 配列間の通常の「切り出し反応」によりパッケージング配列が除去されているため、ウイルス DNA は複製するもののウイルス粒子 (virion) 内に DNA がパッケージングされずウイルスとしては複製しない。一方、遺伝子置換されたアデノウイルスはパッケージング配列を有するため、ウイルスとして複製できるため、「遺伝子 B」に置換された組換えアデノウイルスが高頻度に得られる。

【0071】

遺伝子導入用のアデノウイルスの変異型 F R T 配列の挿入位置は、外来遺伝子 A の隣接部位であってもよいし、アデノウイルスゲノム上の遺伝子 A から離れた部位であってもよい。後者の挿入位置の例としては、L3 遺伝子と E2A 遺伝子との間の非翻訳領域、E3 遺伝子の欠失部位、E4 遺伝子の上流域と右端 ITR との間などが挙げられる。これらの位置に変異型 F R T 配列を挿入して遺伝子置換を行なう場合、生成するアデノウイルス DNA がウイルス粒子 (virion) に効率よくパッケージングされるように、目的遺伝子挿入用プラスミドの野生型 F R T 配列／変異型 F R T 配列間の DNA のサイズを調節する必要があるが、遺伝子置換された組換えアデノウイルスはウイルスの複製に必須の遺伝子を欠失しているため、遺伝子治療用ベクターとして用いる場合、現在のアデノウイルスベクターで問題となっている副作用が軽減できると考えられる。

【0072】

以上の方法を、さらに具体的により詳細に説明する。まず、293 細胞などアデノウイルス E1A 遺伝子を発現し E1 遺伝子を欠失した非増殖型アデノウイルスの増殖に好適な細胞を、〔プロモーター／loxP 配列／薬剤耐性遺伝子／ポリ A 配列、loxP 配列／F L P 遺伝子／ポリ A 配列〕の構造を有する DNA で形質転換し、リコンビナーゼ Cre 依存に F L P を発現する細胞株 (Cre 依存 F L P 発現細胞) を得る。ここで、薬剤耐性遺伝子は形質転換細胞株を選別するために必要であり、その例としてネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子などが挙げられる。また、プロモーターとしては、哺乳動物細胞で機能する限り特に限定されないが、その例として、CAG プロモーター (特開平 3 - 1 6 8 0 8 7 号公報)、EF-1 α プロモーター (Gene, Vol.91, 217-223 (1990))、SR α プロモーター (Molecular and Cellular Biology, Vol.8, 466-472 (1991)) 等が挙げられる。さらに、リコンビナーゼ F L P 遺伝子の 5' 側又は 3' 末端に核移行シグナル配列を接続させていてもよい。

【0073】

遺伝子導入用組換えアデノウイルスは、Cre 依存 F L P 発現細胞にリコンビナーゼ Cre を供給し F L P を発現させる役割を兼ね、左端 ITR とパッケージング配列との間に野生型 F R T 配列を挿入し、E 1 欠失部位に野生型 F R T 配列とリコ

ンビナーゼCre 発現単位（プロモーターとポリA配列を含む）をこの順になるよう挿入し、さらにL3遺伝子とE2A 遺伝子との間の非翻訳領域、E3遺伝子の欠失部位、E4遺伝子の上流域と右端ITR との間のいずれかの位置に変異型F R T配列を挿入しておく。以下の例では、E4遺伝子の上流域と右端ITR との間に変異型F R T配列を挿入した場合について説明する。左端ITR とパッケージング配列との間の野生型F R T配列の挿入部位に特に制限はないが、ヒトアデノウイルス5型の塩基配列で143 ～148 位に挿入するのが好ましい。プロモーターとしては、哺乳動物細胞で機能する限り特に限定されないが、その例として、前述したCAG プロモーター、EF-1 α プロモーター、SR α プロモーター等が挙げられる。さらに、リコンビナーゼCre 遺伝子配列の5' 側又は3' 側の末端に核移行シグナル配列を接続させていることが好ましい。これは、細胞質で合成されたりコンビナーゼCre がその認識配列であるloxP配列を有するDNAに効果的に作用するには、核内に移行する必要があり、核移行シグナル配列はこれを促進する（Daniel Kalderon ら、Cell. 39、499-509 (1984)) からである。核移行シグナル配列を有するCre 遺伝子は、プラスミドpSRNCRE(Kanegae Y. et al., Nucleic Acid Res., Vol.23, 3816-3821 (1995)) 等から得ることができる。

【0074】

外来遺伝子挿入用プラスミドの例としては、〔野生型F R T配列／パッケージング配列／遺伝子Bの発現単位／変異型F R T配列〕の構造を有するプラスミドが挙げられる。ここで野生型F R T配列とパッケージング配列との間のDNA配列に特に制限はないが、遺伝子導入用組換えアデノウイルスと同じDNA配列を有するのが望ましい。

【0075】

前述したCre 依存F L P発現細胞に遺伝子導入用組換えアデノウイルスを感染させるとともに、外来遺伝子挿入用プラスミドで形質転換すると、まず遺伝子導入用組換えアデノウイルスにより発現したCre タンパク質により、Cre 依存F L P発現細胞の2つのloxP配列の間の薬剤耐性遺伝子とポリA配列が除かれ、リコンビナーゼF L Pが発現する。次いでリコンビナーゼF L Pの作用により、Cre を発現する遺伝子導入用組換えアデノウイルスの2つの野生型F R T配列に挟ま

れたパッケージング配列が除かれるとともに、遺伝子導入用組換えアデノウイルスの野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間の Cre 発現単位とアデノウイルスゲノムの大部分 (L1 遺伝子から L5 遺伝子まで) が、外来遺伝子挿入用プラスミドの [野生型 F R T 配列 / パッケージング配列 / 遺伝子 B の発現単位 / 変異型 F R T 配列] と置換される。従って、遺伝子置換により生じたアデノウイルスは、[左端 ITR / F R T 配列 / パッケージング配列 / 遺伝子 B の発現単位 / 変異型 F R T / 右端 ITR] の構造となり、アデノウイルスゲノムの大部分を欠失しているため、このウイルス単独では増殖できない。一方、遺伝子置換しなかった遺伝子導入用組換えアデノウイルスは、パッケージング配列が除かれているため、そのゲノム DNA が複製しアデノウイルスの増殖に必須のタンパク質を産生するものの、そのゲノム自体は感染性ウイルス粒子にパッケージングされないため、ウイルス自体は増殖せずヘルパーウイルスとして作用する。その結果、遺伝子置換により生じたアデノウイルスは、このヘルパーウイルスが産生するアデノウイルスタンパク質によりそのゲノム DNA が複製するとともに、正常なパッケージング配列を有しているため感染性ウイルス粒子にパッケージングされウイルスとして選択的に増殖する。従って、この一連の反応で生じた組換えアデノウイルスの大部分は、遺伝子置換され、かつアデノウイルスゲノムの大部分を欠失した目的アデノウイルスであることが期待される。

【0076】

さらに前記 f72 により、酵母 2 ミクロン DNA 由来の下記の野生型配列 (配列番号: 1) :

【0077】

【化 7】

12345678

5'-GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAAGCTTC-3'

スパーサー領域

【0078】

において、スパーサー領域の 7 番目の塩基に G から C への置換を有する 2 つの変

異型 F R T 配列（配列番号：3 2）を用い、リコンビナーゼ F L P の存在下に特異的 D N A 組換え反応を行なう方法が提供される。

【0 0 7 9】

本発明の変異型 F R T 配列を含有した D N A は、医薬として遺伝子治療にも用いることができる。本発明の医薬は、本発明の D N A を含有しているため、効率よく、染色体への遺伝子を挿入及び除去ができるという優れた性質を有する。本発明の医薬の遺伝子治療への適用を以下に説明する。

【0 0 8 0】

まず、ヒト細胞の染色体に変異型 F R T 配列と野生型 F R T 配列とをあらかじめ挿入する。そのために、変異型 F R T 配列と野生型 F R T 配列とを有する D N A が医薬品として用いられる。該 D N A は、例えば、レトロウイルスやアデノ随伴ウイルス (AAV) などのウイルスベクター中に含まれる形で投与される。なかでも、レトロウイルスによる遺伝子導入は、染色体にランダムに挿入されるが、AAV では染色体の特定の部位（第19番染色体の AAV-S1 領域）に挿入される確率が高いという観点から、AAV を使用することが好ましい。この染色体の特定部位への遺伝子導入には AAV がコードするウイルス遺伝子 (Rep) が必須であるが、現在用いられている AAV ベクターでは AAV 遺伝子の大部分が除かれているため、染色体への特異的組み込み機構は失われている。しかし、変異型 F R T 配列と野生型 F R T 配列とを合わせてもわずか 100 塩基足らずであるため、AAV の全ウイルス遺伝子を保持したまま、2 つの F R T 配列を挿入したウイルスを作製できる。その挿入位置は、AAV 遺伝子の両端に存在する逆方向反復配列 (inverted terminal repeat : ITR) の各々すぐ内側が望ましい。この 2 つの F R T 配列を挿入した AAV をヒトに投与することにより、染色体に 2 つの F R T 配列を挿入することができる。

【0 0 8 1】

次いで、野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間に目的遺伝子を挿入した環状 D N A 分子を含有した医薬と、リコンビナーゼ F L P タンパク質又は F L P 遺伝子を保持した D N A を投与することにより、染色体上に存在する 2 つの F R T 配列の間に挟まれた AAV 遺伝子が除かれ、目的遺伝子に置換される。医薬とし

での環状DNA分子とリコンビナーゼFLPもしくはFLP遺伝子を保持したDNA分子をヒト細胞に導入する方法としては、ウイルスベクターやリポソームベクターなど既存の遺伝子治療に用いられているベクターを用いる方法が挙げられる。

【0082】

このようにして染色体に遺伝子が挿入されたヒト細胞では、目的遺伝子の両端に変異型FRT配列と野生型FRT配列が存在し、さらにその外側にAAVのITRが存在するのみで、AAVの構造遺伝子は存在しないため、AAV由来のタンパク質が発現し抗原となることもなく、目的遺伝子の発現が長期間安定に持続することが期待できる。また、挿入した遺伝子が不要になった場合、野生型FRT配列と変異型FRT配列の間に遺伝子が存在しない環状DNA分子を投与することにより、挿入した遺伝子を染色体から除くことができる。さらに、その後再び染色体への遺伝子の挿入が必要になった場合、2つのFRT配列が染色体上に残っているため、前述した方法で任意の遺伝子を挿入することができる。このように、本発明の変異型FRT配列をもつDNAは、染色体への遺伝子を挿入及び除去が自由にできる遺伝子治療のための医薬品として用いることができる。

【0083】

また、基質特異性の異なる三つ以上のFRT配列を用いることにより、遺伝子置換方法の応用範囲をさらに広げることが可能である。基質特異性の異なる三つのFRT配列の組み合わせとして、例えば、野生型FRT配列と2つの変異型FRT配列、三つの変異型FRT配列等が挙げられる。本方法を、野生型FRT配列、変異型FRT配列1、変異型FRT配列2の三つの異なるFRT配列が同一DNA上に存在する場合を例として説明する。野生型FRT配列、遺伝子A、変異型FRT配列1、遺伝子B及び変異型FRT配列2をこの順に有するDNA(a)に、野生型FRT配列、遺伝子C及び変異型FRT配列1を有する環状DNA(b)とをリコンビナーゼFLPの存在下に反応させると、DNA(a)中の遺伝子Aを遺伝子Cに置換することができる。一方、環状DNA(b)の代わりに、変異型FRT配列1、遺伝子D及び変異型FRT配列2をこの順で有する環状DNA(c)とをリコンビナーゼFLPの存在下に反応させると、DNA(a)

中の遺伝子Bを遺伝子Dに置換することができる。すなわち、異なる環状DNAを用いるだけで、DNA (a) に存在する複数の遺伝子のうち目的の遺伝子のみを任意の遺伝子に置換することができる。

【0084】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではなく、本発明の技術分野における通常の変更ができることは言うまでもない。なお、実施例中のファージ、プラスミド、DNA、各種酵素、大腸菌、培養細胞等を取り扱う諸操作は、特に断らない限り、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual, T. Maniatis ら編、第2版 (1989), Cold Spring Harbor Laboratory」に記載の方法に準じて行なった。

【0085】

実施例 1

<リコンビナーゼFLPを含む細胞抽出液の調製>

(1) リコンビナーゼFLP発現組換えアデノウイルスの作製

リコンビナーゼFLPの翻訳開始コドンの前後の塩基配列をKozak配列に合わせたプラスミドを得るため、以下の操作を行なった。

【0086】

(a) プラスミドpUCFLPは、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の2ミクロンDNA (6318bp: James et al., Nature, Vol. 286, 860-865 (1980)) のSphI部位 (5568番目) からXbaI部位 (703番目) までのFLP遺伝子全長を含む断片 (1457bp) が、プラスミドpUC19のSphI-XbaI部位間に挿入されたプラスミドである。pUCFLPをXbaI及びSphIで消化し、FLP遺伝子全長を含む約1.5kbの断片を得た。

【0087】

(b) 5'末端突出側がHindIII切断部位と、もう一方の末端がSphI切断部位と結合可能で、かつ翻訳開始コドンの上流にPstI部位を有する以下の配列の合成DNAアダプターを調製した。

【0088】

5'-AG CTT CTG CAG CAG ACC GTG CAT CAT G-3' (配列番号: 1 0)

3'-A GAC GTC GTC TGG CAC GTA-5' (配列番号: 1 1)

【0 0 8 9】

(a) 及び (b) の両DNAをpUC19 のH i n d III-X b a I 部位間に挿入し、プラスミドpUKFLP (4. 1 k b) を得た。

【0 0 9 0】

pUKFLPをP s t I 及びF s p I で消化後平滑化したF L Pコード領域を含む1. 4 k bの断片を、コスミドベクターpAxCawt のプロモーターとポリA配列との間のS w a I 部位に挿入し、コスミドベクターpAxCALPを得た。

【0 0 9 1】

pAxCALPとアデノウイルスDNA-末端タンパク質複合体とを既知の方法(Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93, 1320-1324 (1996) 及び特開平7-298877号公報) に従いリン酸カルシウム共沈法で293細胞を形質転換し、目的のF L P発現組換えアデノウイルスAxCALP (E 1 及びE 3 遺伝子欠失) を得た。

【0 0 9 2】

(2) リコンビナーゼF L Pを含む細胞抽出液の調製

リコンビナーゼF L P依存組換え反応に用いるF L Pを含む細胞抽出液を得る目的で以下の操作を行なった。AxCALP(約 1×10^9 PFU)を、225cm²フラスコ1本の293細胞(ヒト胎児腎臓由来細胞株)に感染(37℃、1時間)させ、培地(5% FCS含有DMEM培地)を添加後さらに24時間培養した。培養終了後、低速遠心機で1000回転5分遠心し、培養上清を捨て細胞を集めた。細胞に保存用緩衝液[10%グリセロール/20mMトリス塩酸(pH7.5)/300mM塩化ナトリウム/1mM EDTA(pH7.5)]1mlを加え細胞を懸濁し、密閉型ソニケーターで200W、3分(30秒×6回)細胞を破碎し、細胞内に存在するリコンビナーゼF L Pを放出させた。得られた細胞破碎液を高速遠心機で10,000回転20分遠心し、その上澄に最終濃度0.1mMとなるようPMSF(フェニルメチルスルフォニルフロライド)を加え冷凍保存(-80℃)した。

【0 0 9 3】

実施例 2

＜変異型 F R T 配列を含む基質 DNA の調製＞

(1) 変異型 F R T 配列を含む合成 DNA の作製

野生型 F R T 配列の 8 塩基のスペーサー部分を他の塩基に置換した変異型 F R T 配列を含む 52 塩基の合成 DNA を作製した。また同時に野生型 F R T 配列を含む 52 塩基の合成 DNA も作製した。野生型 F R T 配列の合成 DNA の構造を図 1 (センス鎖は配列番号：1 2、アンチセンス鎖の配列番号：1 3) に、変異型 F R T 配列を含む 9 種類の合成 DNA の配列 (センス鎖及びアンチセンス鎖) 及び該野生型 F R T 配列の合成 DNA の配列を図 2 に示す。

【0 0 9 4】

野生型センス鎖とアンチセンス鎖は相補配列ではなく、各々の鎖をアニーリングし二本鎖 DNA とした際、5' 末端がそれぞれ 4 塩基突出し、各々の末端が制限酵素 XhoI 及び SpeI の消化断片になるように設計した。そのため、これらの二本鎖 DNA は、XhoI 断片側は制限酵素 XhoI 及び SalI 消化断片と、SpeI 断片側は制限酵素 SpeI 及び NheI 消化断片と結合できる。

【0 0 9 5】

全ての一本鎖合成 DNA は、5' 末端を T4 ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、それぞれの変異に対応するセンス鎖及びアンチセンス鎖をアニーリングした。以後、この二本鎖合成 DNA を変異型 F R T 合成 DNA と呼ぶ。

【0 0 9 6】

(2) 2 つの野生型 F R T 配列もしくは 2 つの同じ配列の変異型 F R T 配列を含む基質 DNA の調製

直鎖状 DNA の両端に同じ配列の変異型 F R T 配列を有する基質 DNA を得る目的で、以下の操作を行なった。

【0 0 9 7】

プラスミド pBR322 を制限酵素 NheI 及び SalI で同時に消化し、野生型 F R T 又は変異型 F R T 合成 DNA 9 種類をそれぞれライゲーション反応 (プラスミド：合成 DNA のモル比 1 : 20) を行なった後、制限酵素 XhoI 及び SpeI で同時に消化した。この制限酵素消化により pBR322 DNA の両端に複数個結合した野生型もし

くは変異型 F R T 合成 D N A が除かれ、pBR322 D N A の両端に野生型もしくは同じ配列の変異型 F R T 合成 D N A が各一ヶ所ずつ結合した約 4.1kb の直鎖状 D N A が生じる。次いでこれら反応物をアガロース電気泳動し、約 4.1kb のバンドをゲルから切り出した後 GEANCLEAN II (BIO101社製) により精製した。この操作により、p B R 3 2 2 D N A の両端に 2 つの野生型 F R T 配列もしくは 2 つの同じ配列の変異型 F R T 配列が結合した直鎖状 D N A 断片を得た。

【 0 0 9 8 】

この断片にアデノウイルス 5 型由来の D N A 断片を結合したプラスミドを構築するため、以下の操作を行なった。

【 0 0 9 9 】

アデノウイルス 5 型の E1 及び E3 遺伝子以外のほぼ全長が挿入されたコスミドベクター p A x c w (特開平 8-308585 号公報 15 頁) を制限酵素 XbaI 及び XhoI で同時に消化し、生じた D N A 断片のうちの 3.8kb の断片 (アデノウイルス 5 型塩基配列 24,796 - 28,592 番目) を単離した。この 3.8kb の断片と、前述した p B R 3 2 2 D N A の両端に同じ配列の F R T 合成 D N A が結合した D N A 断片とをリガーゼで結合すると、制限酵素 SpeI 断片と XbaI 断片とが結合した結果、環状化した。この D N A で大腸菌を形質転換し、2 つの野生型 F R T 配列もしくは 2 つの同じ配列の変異型 F R T 配列を有するプラスミド pBxxAxx (7.9kb、図 3) を得た。なお、pBxxAxx は同じ配列の 2 つの F R T 配列を有するプラスミドの総称で、例えば、F R T 配列が野生型の場合は pBfwtAfwt と、F3 の場合は pBF3AF3 と、f2161 の場合は pBf2161Af2161 と称する。

【 0 1 0 0 】

pBfwtAfwt 並びに変異型 F R T 配列を含む 9 種類のプラスミドを制限酵素 DraI で消化し、次に示す F L P 依存 D N A 組換え反応の基質 D N A として用いた。

【 0 1 0 1 】

実施例 3

＜ 2 つの同じ配列の変異型 F R T 配列間での F L P 依存 D N A 組換え反応 ＞

以下に示すアッセイ方法で、2 つの変異型 F R T 配列間で F L P 依存組換え反応が起きるかどうかを検討した。終濃度、50mM トリス塩酸 (pH7.5) / 10mM MgCl₂

／5mM DTT を含む緩衝液に、実施例 2 で調製した DraI 消化済みプラスミド DNA (1.5 μ g) と実施例 1 で調製した FLP を含む細胞抽出液 25 μ l を加え (反応液量 50 μ l)、30℃ で 30 分反応した。反応終了後、反応液に 200 μ l の滅菌水及び 50 μ l の 20mM EDTA 溶液 (pH8.0) を加え、フェノール／クロロホルム抽出並びにクロロホルム抽出を行ない、さらにエタノール沈殿し、得られた DNA を RNaseA (20 μ g/ml) を含む TE バッファー (pH8.0) 20 μ l に溶解した。次いで、その全量を制限酵素 NcoI 消化し、アガロースゲル電気泳動後、臭化エチジウム (EtBr) 染色により検出された DNA のバンドを解析した。

【0102】

基質 DNA には制限酵素 NcoI サイトが一ヶ所のみ存在するので、FLP による組換え反応を行わない DraI 消化済みの基質 DNA (7.2kb と 0.7kb) を制限酵素 NcoI 消化すると、5.9kb、1.3kb に 0.7kb を加えた 3 本のバンドが生じる。一方、基質 DNA が FLP により組換え反応を起こすと、変異型 FRT を 1 個有する約 3.8kb の環状 DNA と変異型 FRT を 1 個有する約 3.4kb の直鎖状 DNA が生じるので、これらを制限酵素 NcoI 消化すると、前記 3.8kb 及び 3.4kb のバンドに 0.7kb のバンドを加えた 3 本のバンドが生じる (図 4 参照)。従って、3.8kb 及び 3.4kb のバンドは FLP による組換え反応が起きたことを示し、5.9kb 及び 1.3kb のバンドは FLP による組換え反応が起きていないことを示すので、これらのバンドの量比により組換え反応の効率が分かる。

【0103】

なお、反応効率を数値化するため、3.8kb 及び 3.4kb のバンドの DNA 量の合計に対する反応系の全 DNA 量の比を、2 つの FRT 配列間の組換え率 (%) として算出した。

【0104】

本測定方法における野生型 FRT 配列間の組換え率は 4.8% で、先行技術である F3 の変異型 FRT 配列間の組換え率は 3.1% と、野生型 FRT 配列より明らかに低い値であった。それに比べ、f2161 の組換え率は 4.5%、f2262 の組換え率は 3.8% と、いずれも F3 よりも高い組換え率を示した。また、f2151 は 2.9%、f61 は 2.6% と F3 よりやや低い組換え率であり、f2272 と f2273 のそれぞれの組換え率は 0 で

あった。さらに、公知配列 f72 の組換え率は 10.9% であり野生型の 2 倍以上であった。

【0105】

以上の結果より、本発明の f2161 及び f2262 の変異型 F R T 配列は、先行技術である F3 の変異型 F R T 配列よりも組換え効率の点で優れており、また、f2151 と f61 は F3 とほぼ同程度の反応効率であることが示された。

【0106】

実施例 4

<野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間での F L P 依存 DNA 組換え反応>

(1) 野生型 F R T 配列を 1 つ有するプラスミド (pBRFRT) の構築

プラスミド pBR322 に野生型 F R T 配列が 1 つ挿入されたプラスミド (pBRFRT) を構築するため、以下の (a) 及び (b) の操作を行なう。

【0107】

(a) プラスミド pBR322 の制限酵素 NheI サイトから EcoNI サイト間の約 0.4kb の断片を、XhoI リンカーを用いて野生型 loxP 配列を含む DNA に置換したプラスミド pBRwt (Lee, G. et al., Gene Vol.14, 55-65 (1998)) を制限酵素 XhoI で消化する。この断片と実施例 2 - (1) で作製した野生型 F R T 配列を含む 52塩基の合成 DNA とをライゲーション後、制限酵素 SpeI 及び PstI で同時に消化し、pBR322 DNA の両端に複数個結合した野生型 F R T 合成 DNA を除く。次いで反応物をアガロース電気泳動し、約 3kb のバンドをゲルから切り出し、野生型 F R T を 1 つ含む約 3.0kb の断片を得る。

【0108】

(b) プラスミド pBR322 を制限酵素 PstI 及び NheI で同時に消化後、アガロース電気泳動し、生じた 2 本の DNA バンドのうち約 1.0kb の断片を回収する。

【0109】

(a) 及び (b) で調製した両 DNA をライゲーションし、pBR322 の NheI サイトと EcoNI サイトとの間に野生型 F R T 配列が 1 つ挿入されたプラスミド pBRFRT (4.4kb、図 5) を得る。

【0 1 1 0】

(2) 野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列とを含むプラスミドの構築並びに基質 D N A の調製

プラスミド pBRFRT の野生型 F R T 配列から約 30bp 離れた位置に SalI サイトが存在するので、pBRFRT を制限酵素 SalI で消化し直鎖状にした後、実施例 2 - (1) で作製した変異型 F R T 配列を含む 52塩基の合成 D N A (9種類) を各々ライゲーションする。この操作により pBRFRT の SalI 消化部位に変異型 F R T 合成 D N A の XhoI 消化断片側が結合する。次いで、反応液を制限酵素 SpeII 及び XhoI で同時に消化し、pBRFRT の両端に複数個結合する変異型 F R T 合成 D N A を除いた後、未反応及び制限酵素消化された変異型 F R T 合成 D N A を GEANCLEAN II (BI0101 社製) により反応液から除き、片方の端に野生型 F R T 配列が、他方の端に変異型 F R T 配列が各 1 つ結合した直鎖状 D N A (約 4.1kb) を得る。

【0 1 1 1】

この断片と実施例 2 - (2) で調製したアデノウイルス 5 型ゲノムを制限酵素 XhoI と XbaI とで同時に消化した約 3.8kb とをライゲーションし、プラスミド pBfw tAxx (7.9kb、図 6) を得る。なお、プラスミド pBfw tAxx は上記方法により構築した一連のプラスミドの総称で、実際には図 2 に示した変異型 F R T 配列と野生型 F R T 配列とを各 1 つずつ有する個々のプラスミドのことである。

【0 1 1 2】

プラスミド pBfw tAxx を制限酵素 DraI で消化し、次に示す F L P 依存 D N A 組換え反応の基質 D N A として用いる。

【0 1 1 3】

(3) 野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間での F L P 依存 D N A 組換え反応

前述した基質 D N A を実施例 3 で示した反応液に加え、30℃で30分 F L P 依存組換え反応を行なう。反応終了後の D N A を精製し、制限酵素 NcoI 消化後アガロースゲル電気泳動を行ない、EtBr 染色により検出される D N A のバンドを解析する。

【0 1 1 4】

基質DNAには、制限酵素NcoIサイトが1か所のみ存在するので、FLPによる組換え反応を行なわないDraI消化済みの基質DNA (7.2kbと0.7kb)を制限酵素NcoI消化すると、5.9kb断片、1.3kb断片に0.7kbを加えた3本のバンドが生じる。一方、基質DNAがFLPにより組換え反応を起こすと、FRT配列を1個有する約3.8kbの環状DNAとFRT配列を1個有する約3.4kbの直鎖状DNAが生じるので、これらを制限酵素NcoI消化すると3.8kb、3.4kbに0.7kbを加えた3本のバンドが生じる(図7参照)。従って、3.8kb及び3.4kbのバンドはFLPによる組換え反応が起きたことを示し、5.9kb及び1.3kbのバンドはFLPによる組換え反応が置き換えていないことを示すので、これらのバンドの量比により組換え効率が示される。

【0115】

実施例 5

<野生型FRT配列と変異型FRT配列との間でのFLP依存DNA組換え反応>

(1) 野生型FRT配列と変異型FRT配列とを含むプラスミドの構築並びに基質DNAの調製

34bpの野生型FRT配列を含む54塩基の合成DNA(配列番号:33)及びその相補鎖をプラスミドpUC18のSmaI部位に挿入して、野生型FRT配列が同方向に2個挿入され、かつ2個の野生型FRT配列間にSwaI部位を有したプラスミドpUFwF(2.8kb、図8中のA)を得た。

【0116】

プラスミドpCALNLZ (Y. Kanegae et. al., Gene, Vol.181, 207-212 (1996))をMluI及びXhoIで消化後平滑化したネオマイシン耐性遺伝子とSV40のポリA配列とを含む断片を得た。ついで前記ネオマイシン耐性遺伝子とSV40のポリA配列を含む断片とをpUFwFのSwaI部位に挿入し、プラスミドpUFNF(3.9kb、図8中のB)を得た。

【0117】

プラスミドpCALNLw (Kanegae Y. et. al., Gene, Vol.181, 207-212 (1996))のSwaI部位に27塩基の合成ポリリンカー(5'-AAA TTG AAT TCG AGC TCG GT

A CCC GGG-3'、配列番号：34）及びその相補鎖を挿入し、プラスミドpCALNL5（6.1kb、図8中のC）を得た。次いで、pUFNFをBamHI及びAsp718で消化後平滑化したFRT配列／ネオマイシン耐性遺伝子／SV40のポリA配列／FRT配列を含む約1.2kbの断片を得た。前記約1.2kbの断片と、pCALNL5をMluI及びXhoIで消化後平滑化したCAGプロモーターを含む約4.9kbの断片とを連結し、プラスミドpCAFNF5（6.1kb、図8中のD）を得た。pCAFNF5は、野生型FRT配列とグロビンポリA配列との間にcDNA挿入用のポリリンカー（SwaI-EcoRI-ScaI-KpnI-SmaI部位）を有する。

【0118】

プラスミドpCAFNF5をSalI及びPvuIIで消化後、末端を平滑化し、さらに自己ライゲーションさせ、〔プロモーター-野生型FRT配列-ネオマイシン耐性遺伝子の一部〕を除いたプラスミドpdNF（4.1kb、図8中のE）を得た。

【0119】

実施例2で作製した、二つの同じ配列の変異型FRT配列を有するプラスミドpBxxAxx（xxはf72、f2161、f2262もしくはF3のいずれか）をBspEI及びAatIIで同時に消化し、変異型FRT配列を有する約50bpの断片（a）を得た。一方、プラスミドpdNFをBspEI及びAatIIで同時に消化し、野生型FRT配列を含まない断片（b）を得た。前記（a）及び（b）の両断片をライゲーションし、pdNFの野生型FRT配列を変異型FRT配列に置換したプラスミドpdNmF（4.1kb、図8のF）を得た。

【0120】

緑色蛍光タンパク質(GFP)の変異体をコードするDNAが挿入された市販発現プラスミドpEGFP-C1（4.7kb、CLONTECH社製）の、GFP遺伝子の3'末端とポリA配列との間に存在するマルチクローニングサイト中のBglII部位とXhoI部位との間に、両端がBglII部位並びにXhoI部位であり、かつ内部に連続した二つの終止コドンを含むように設計した下記の18塩基の合成DNAリンカー：

【0121】

5'-GATCTTACTAGTAGGATC-3'

(配列番号: 35)

3'-AATGATCATCCTAGAGCT-5'

(配列番号: 36)

【0122】

を挿入し、プラスミドpEGFP-s (4.7kb) を得た。

【0123】

プラスミドpEGFP-s を Age I 及び Xho I で同時に消化し、さらに Klenow 酵素で両端を平滑化して、GFP 遺伝子全長を含む約 0.8kb の DNA 断片 (a) を得た。また、アデノウイルス E1 及び E3 遺伝子以外のアデノウイルス 5 型ゲノムの大部分を含み、かつ E1 遺伝子欠失部位に CAG プロモーターが挿入されたコスミドベクター pAxCawt (Kanegae Y. et. al., Nucleic acid Res., Vol.23, 3816-3821 (1995)) には、プロモーターとポリ A 配列との間に Cla I 部位-Swa I 部位-Cla I 部位の順にクローニング部位が存在する。そこで、pAxCawt を Swa I 消化した後、前述した約 0.8kb の DNA 断片 (a) を連結しコスミドベクター pAxCAGFP を得た。

【0124】

pAxCAGFP を Sal I 消化後、自己ライゲーションさせ、アデノウイルス DNA の大部分を除いた (左端約 0.4kb は含む) プラスミド pxCAGFP (6.1kb、図 8 中の G) を得た。pxCAGFP は GFP 遺伝子の両端に Cla I 部位が存在するので、pxCAGFP を Cla I 消化した後、Klenow 酵素で両端を平滑化した GFP 遺伝子全長を含む約 0.8kb の DNA 断片を得た。この断片を前述したプラスミド pCAFNF5 のポリリンカー中の Sma I 部位に挿入し、プラスミド pCAFNF6 (6.9kb、図 8 中の H) を得た。

【0125】

最後に、プラスミド pCAFNF6 の Csp45 I 部位から EcoR I 部位間と、プラスミド pdNF の Csp45 I 部位から EcoR I 部位間とを置換し、最終的な目的プラスミド pCAFNF6G (6.9kb、図 8 中の I) を得た。プラスミド pCAFNF6G は野生型 FRT 配列と変異型 FRT 配列とを各 1 つずつ含む一連のプラスミドの総称である。前記 pCAFNF6G は、実際には f72、f2161、f2262 もしくは F3 のいずれ

かの変異型 F R T 配列 (mF) を含んでいる。

【0126】

これらのプラスミド pCAFNmFG もしくは二つの野生型 F R T 配列を含むプラスミド pCAFNFNG を制限酵素 H i n d I I I で消化して直鎖状 DNA とした後、次に示す F L P 依存組換え反応の基質 DNA として用いた。

【0127】

(2) 野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間での F L P 依存 DNA 組換え反応

終濃度 50mM トリス塩酸 (pH7.5) / 10mM MgCl₂ / 5mM DTT を含む緩衝液に、前述した基質 DNA 1 μ g と実施例 1 で調製した F L P を含む細胞抽出液 25 μ l とを加え (反応液量 50 μ l)、30℃ で 30 分反応した。反応終了後、反応液に 200 μ l の滅菌水及び 50 μ l の 20mM EDTA 溶液 (pH8.0) を加え、フェノール/クロロホルム抽出並びにクロロホルム抽出を行ない、さらにエタノール沈殿した。得られた DNA を、RNaseA (20 μ g/ml) を含む T E バッファー (pH8.0) 20 μ l に溶解した。次いで、その全量を制限酵素 F s p I で消化し、アガロースゲル電気泳動後、臭化エチジウム (EtBr) 染色により検出された DNA のバンドを解析した。

【0128】

H i n d I I I 消化済みの基質 DNA には制限酵素 F s p I 部位が二ヶ所存在し、F L P による組換え反応が起きない場合は、基質 DNA を制限酵素 F s p I 消化すると 2.8kb、2.4kb、1.8kb の 3 本のバンドが生じる。一方、基質 DNA が F L P により組換え反応を起こすと、約 5.7kb の直鎖状 DNA と約 1.2kb の環状 DNA とが生じ、これらを制限酵素 F s p I 消化すると、3.9kb、1.2kb、1.8kb の 3 本のバンドが生じる (図 9)。従って、3.9kb 及び 1.2kb のバンドは F L P による組換え反応が起きたことを示し、2.8kb 及び 2.4kb のバンドは F L P による組換え反応が起きていないことを示すので、これらのバンドの量比により組み換え反応の効率が分かる。そこで、反応効率を数値化するため、反応後の全 DNA 量に対する 3.9kb のバンドの比を、二つの F R T 配列間の組換え率 (単位: %) として算出した。

【0129】

本測定方法を用いて野生型 F R T 配列間の組換え率を求めると約 28% であった。一方、野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列との間の組換え反応では、測定した全ての変異型 F R T 配列 (f2161、f2262、f72 並びに F3) の組換え率は、検出限度以下 (0.2%未満) であった。

【0 1 3 0】

本実施例並びに実施例 3 の結果より、本発明の f2161 及び f2262 の変異型 F R T 配列は、野生型 F R T 配列とは組換え反応が起きないが、同一配列の変異型 F R T 配列間では効率よく組換え反応が起きることが明らかになった。

【0 1 3 1】

配列表フリーテキスト

配列番号：1 0 は、合成 DNA アダプターの配列である。

【0 1 3 2】

配列番号：1 1 は、合成 DNA アダプターの配列である。

【0 1 3 3】

配列番号：1 2 は、野生型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 3 4】

配列番号：1 3 は、野生型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 3 5】

配列番号：1 4 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 3 6】

配列番号：1 5 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 3 7】

配列番号：1 6 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 3 8】

配列番号：1 7 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 3 9】

配列番号：1 8 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 4 0】

配列番号：1 9 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 4 1】

配列番号：2 0 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 4 2】

配列番号：2 1 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 4 3】

配列番号：2 2 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 4 4】

配列番号：2 4 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 4 5】

配列番号：2 5 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 4 6】

配列番号：2 6 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 4 7】

配列番号：2 7 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 4 8】

配列番号：2 8 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 4 9】

配列番号：2 9 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 5 0】

配列番号：3 0 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 5 1】

配列番号：3 1 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 5 2】

配列番号：3 2 は、変異型 F R T 配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 5 3】

配列番号：3 3 は、F L P 認識配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 5 4】

配列番号：3 4 は、順に S w a I、E c o R I、S c a I、K p n I 及び S m a I の認識配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 5 5】

配列番号：3 5 は、B g l I I I 認識配列、2 つの終止コドン及び X h o I 認識配列をコードする配列を基にデザインされたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 5 6】

配列番号：3 6 は、B g l I I I 認識配列、2 つの終止コドン及び X h o I 認識配列をコードする配列を基にデザインされたオリゴヌクレオチドの配列である。

【0 1 5 7】

【発明の効果】

本発明の変異型 F R T 配列を含有した D N A は、リコンビナーゼ F L P の存在下、野生型 F R T 配列とは組換え反応が起きないが、同一配列の 2 つの変異型 F R T 配列での組換え反応が起こるという優れた性質を発現する。したがって、高い効率の遺伝子置換方法が可能になるという優れた効果を奏する。さらに本発明 D N A により、野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列、又は異なる配列の変異型 F R T 配列を組み合わせて、動物細胞をはじめとする高等真核細胞における、効率の高い遺伝子置換方法が提供される。

【 0 1 5 8 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.

<120> DNA comprising mutant FRT sequence

<130> SP-11-006

<160> 36

【 0 1 5 9 】

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

gaagtttccta tactttctag agaataggaa cttc

34

【 0 1 6 0 】

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

gaagttccta tactctctgg agaataggaa cttc

34

【 0 1 6 1 】

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3

gaagttccta tactctccag agaataggaa cttc

34

【 0 1 6 2 】

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 4

gaagttccta tactatcttg agaataggaa cttc

34

【 0 1 6 3 】

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 5

gaagttccta tactttctgg agaataggaa cttc

34

【 0 1 6 4 】

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 6

gaagttccta tactatttga agaataggaa cttc

34

【 0 1 6 5 】

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 7

gaagttccta taccttgtga agaataggaa cttc

34

【 0 1 6 6 】

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 8

gaagttccta tactatctac agaataggaa cttc

34

【 0 1 6 7 】

<210> 9

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 9

gaagttccta tactgtctat agaataggaa cttc

34

【 0 1 6 8 】

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The oligonucleotide is synthesized DNA adaptor.

<400> 10

agcttctgca gcagaccgtg catcatg

27

【 0 1 6 9 】

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The oligonucleotide is synthesized DNA adaptor.

<400> 11

atgcacgggtc tgctgcaga

19

【 0 1 7 0 】

<210> 12

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on wild type FRT sequence.

<400> 12

tcgaggacgt cgaagttcct atactttcta gagaatagga acttctccgg aa 52

【 0 1 7 1 】

<210> 13

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on wild type FRT sequence.

<400> 13

ctagttccgg agaagttcct attctctaga aagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 7 2 】

<210> 14

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 14

tcgaggacgt cgaagttcct atactatcta gagaatagga acttctccgg aa

52

【 0 1 7 3 】

<210> 15

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 15

tcgaggacgt cgaagttcct atactttctg gagaatagga acttctccgg aa

52

【 0 1 7 4 】

<210> 16

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 16

tcgaggacgt cgaagttcct atactttcta cagaatagga acttctccgg aa

52

【 0 1 7 5 】

<210> 17

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 17

tcgaggacgt cgaagttcct atactatttg aagaatagga acttctccgg aa 52

【 0 1 7 6 】

<210> 18

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 18

tcgaggacgt cgaagttcct atactctctg gagaatagga acttctccgg aa 52

【 0 1 7 7 】

<210> 19

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 19

tcgaggacgt cgaagttcct atactatcta cagaatagga acttctccgg aa 52

【 0 1 7 8 】

<210> 20

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 20

tcgaggacgt cgaagttcct atactctcca gagaatagga acttctccgg aa 52

【 0 1 7 9 】

<210> 21

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 21

tcgaggacgt cgaagttcct atactatctt gagaatagga acttctccgg aa 52

【 0 1 8 0 】

<210> 22

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 22

tcgaggacgt cgaagttcct atactgtcta tagaatagga acttctccgg aa 52

【 0 1 8 1 】

<210> 23

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 23

ctagttccgg agaagttcct attctctaga tagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 8 2 】

<210> 24

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 24

ctagttccgg agaagttcct attctccaga aagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 8 3 】

<210> 25

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 25

ctagttccgg agaagttcct attctgtaga aagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 8 4 】

<210> 26

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 26

ctagttccgg agaagttcct attcttcaaa tagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 8 5 】

<210> 27

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 27

ctagttccgg agaagttcct attctccaga gagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 8 6 】

<210> 28

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 28

ctagttccgg agaagttcct attctgtaga tagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 8 7 】

<210> 29

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 29

ctagttccgg agaagttcct attctctgga gagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 8 8 】

<210> 30

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 30

ctagttccgg agaagttcct attctcaaga tagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 8 9 】

<210> 31

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 31

ctagttccgg agaagttcct attctataga cagtatagga acttcgacgt cc 52

【 0 1 9 0 】

<210> 32

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 32

gaagttccta tactttctac agaataggaa cttc 34

【 0 1 9 1 】

<210> 33

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on FLP recognition sequence.

<400> 33

aaattccgga gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcgacgtc attt 54

【 0 1 9 2 】

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide as polylinker based on recognition sequences of SmaI, EcoRI, ScaI, KpnI and SmaI, in this order.

<400> 34

aaattgaatt cgagctcggt acccggg 27

【 0 1 9 3 】

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide as linker based on sequence encoding BglI

I recognition sequence, two stop codons, and XhoI recognition sequence.

<400> 35

gatcttacta gtaggac

18

【 0 1 9 4 】

<210> 36

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide as linker based on sequence encoding BglI
I recognition sequence, two stop codons, and XhoI recognition sequence.

<400> 36

tcgagatcct actagtaa

18

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、野生型 F R T 配列の合成 DNA の構造を示す図である。（s）はセンス鎖（配列番号：1 2）を、（a）はアンチセンス鎖（配列番号：1 3）を示す。

【図 2】

図 2 は、変異型 F R T 配列を含む合成した DNA の配列を示す。下線は、野生型から置換した塩基を示す。

【図 3】

図 3 は、プラスミド pBxxAxx の構造を示す模式図である。太線部分はアデノウイルス由来であり、細線部分は pBR322 由来である。「M」は変異型 F R T 配列を意味し、文字上の矢印は F R T 配列の向きを示す。Ap^R はアンピシリン耐性遺伝

子、ori は大腸菌の複製開始起点を示す。

【図 4】

図 4 は 2 つの同じ配列の変異型 F R T 間でのリコンビナーゼ F L P 依存組換え反応の測定法の原理を示す模式図である。太線部分はアデノウイルス由来であり、細線部分は pBR322 由来である。

【図 5】

図 5 は、プラスミド pBRFRT の構造を示す模式図である。「F」は野生型 F R T 配列を意味し、文字上の矢印は F R T 配列の向きを示す。Ap^R はアンピシリン耐性遺伝子、ori は大腸菌の複製複製開始起点を示す。

【図 6】

図 6 は、プラスミド pBfwAxx の構造を示す模式図である。太線部分はアデノウイルス由来であり、細線部分は pBR322 由来である。「F」は野生型 F R T 配列を、「M」は変異型 F R T 配列を意味し、文字上の矢印は F R T 配列の向きを示す。Ap^R はアンピシリン耐性遺伝子、ori は大腸菌の複製開始起点を示す。

【図 7】

図 7 は野生型 F R T 配列と変異型 F R T との間でのリコンビナーゼ F L P 依存組換え反応の測定法の原理を示す模式図である。「F」及び白抜きの箱は野生型 F R T 配列を、「M」及び黒塗りの箱は変異型 F R T 配列を意味し、文字上の矢印は F R T 配列の向きを示す。また、太線部分はアデノウイルス由来であり、細線部分は pBR322 由来である。

【図 8】

図 8 は、プラスミド pCAFN^mFG の構築方法を示す模式図である。図中、wF は野生型 F R T 配列を、mF は変異型 F R T 配列を示す。また、CAG は CAG プロモーターを、GpA はグロビンポリ A 配列を、pA は、SV40 のポリ A 配列を、Ad5 はヒトアデノウイルス 5 型ゲノムの一部を示す。

【図 9】

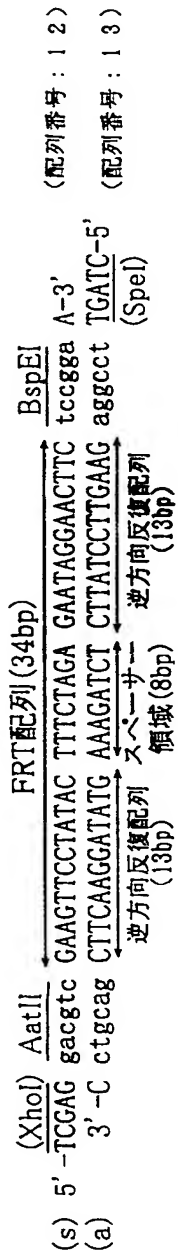
図 9 は、野生型 F R T 配列と変異型 F R T 配列の間でのリコンビナーゼ F L P 依存組換え反応の原理を示す模式図である。図中、白抜きの矢印は F R T 配列を、矢印は制限酵素 F s p I 部位を示す。また、数字は F s p I 消化 DNA 断片

の長さ (k b) を示す。

【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】

センス鎖

123456 78

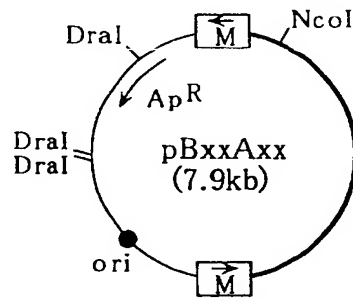
wtPRTs	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTTCT	ATACTTTCTA	GAGAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 1 2)
f22s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTTCT	ATACTATCTA	GAGAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 1 4)
f61s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTTCT	ATACTTTCTG	GAGAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 1 5)
f72s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTTCT	ATACTTTCTA	GAGAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 1 6)
F3s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTTCT	ATACTATTCG	GAGAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 1 7)
f2161s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTTCT	ATACTTCTCT	GAGAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 1 8)
f2272s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTTCT	ATACTATCTA	GAGAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 1 9)
f2151s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTTCT	ATACTTCTCA	GAGAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 2 0)
f2262s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTTCT	ATACTATCTT	GAGAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 2 1)
f2373s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTTCT	ATACTTCTCT	TAGAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 2 2)

アンチセンス鎖

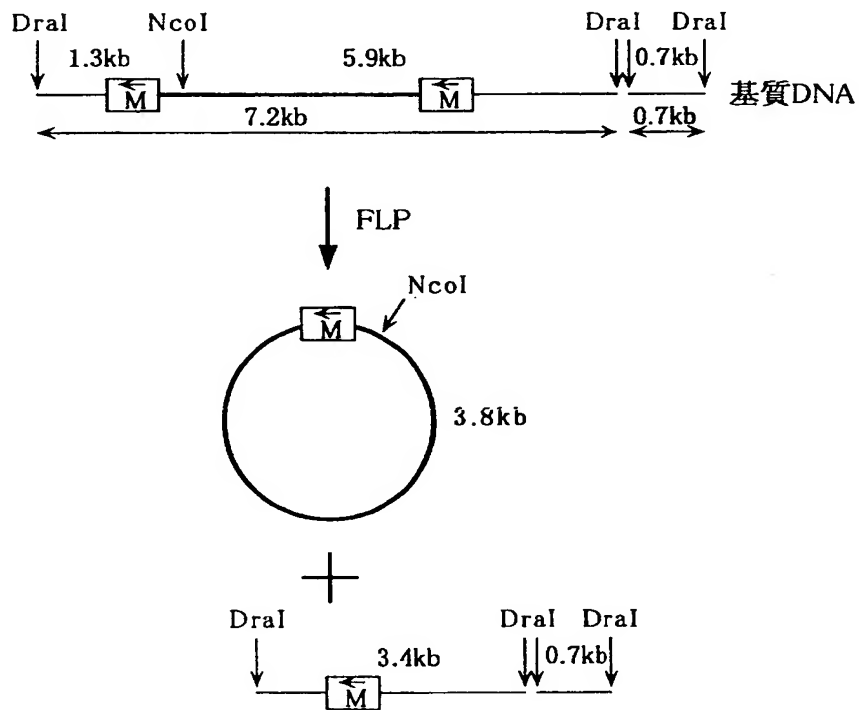
876543 21

wtPRTa	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTTCT	ATTCTCTAGA	AAGTATAGGA	ACTTCCACGT	CC-3'	(配列番号: 1 3)
f22a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTTCT	ATTCTCTAGA	TAGTATAGGA	ACTTCCACGT	CC-3'	(配列番号: 2 3)
f61a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTTCT	ATTCTCCAGA	AAGTATAGGA	ACTTCCACGT	CC-3'	(配列番号: 2 4)
f72a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTTCT	ATTCTGTAGA	AAGTATAGGA	ACTTCCACGT	CC-3'	(配列番号: 2 5)
F3a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTTCT	ATTCTTCAAA	TAGTATAGGA	ACTTCCACGT	CC-3'	(配列番号: 2 6)
f2161a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTTCT	ATTCTCTAGA	TAGTATAGGA	ACTTCCACGT	CC-3'	(配列番号: 2 7)
f2272a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTTCT	ATTCTGTAGA	TAGTATAGGA	ACTTCCACGT	CC-3'	(配列番号: 2 8)
f2151a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTTCT	ATTCTCTTGA	TAGTATAGGA	ACTTCCACGT	CC-3'	(配列番号: 2 9)
f2262a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTTCT	ATTCTCAAGA	TAGTATAGGA	ACTTCCACGT	CC-3'	(配列番号: 3 0)
f2373a	5'-CTAGTTCCGG	AGAAGTTTCT	ATTCTATAGA	TAGTATAGGA	ACTTCCACGT	CC-3'	(配列番号: 3 1)

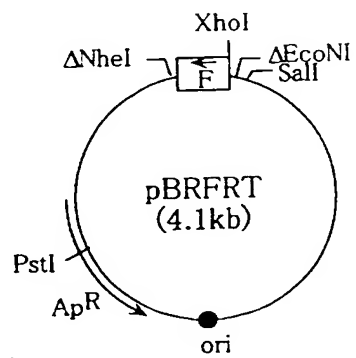
【図 3】



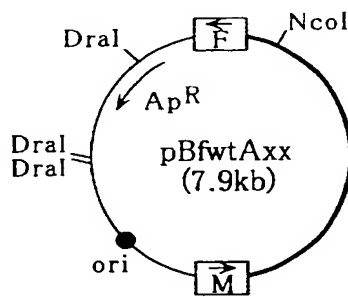
【図 4】



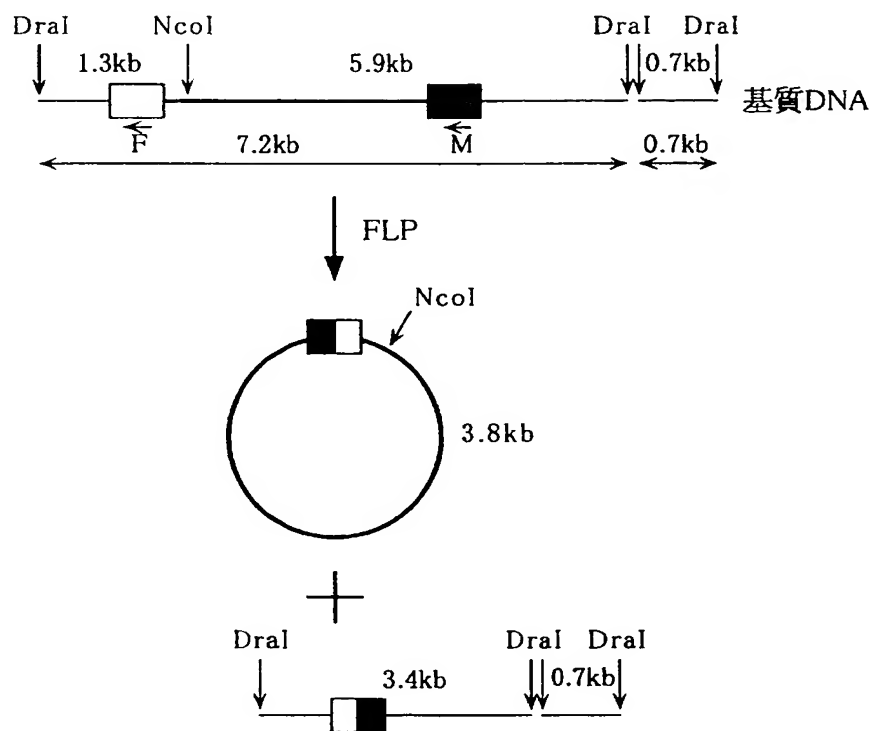
【図 5】



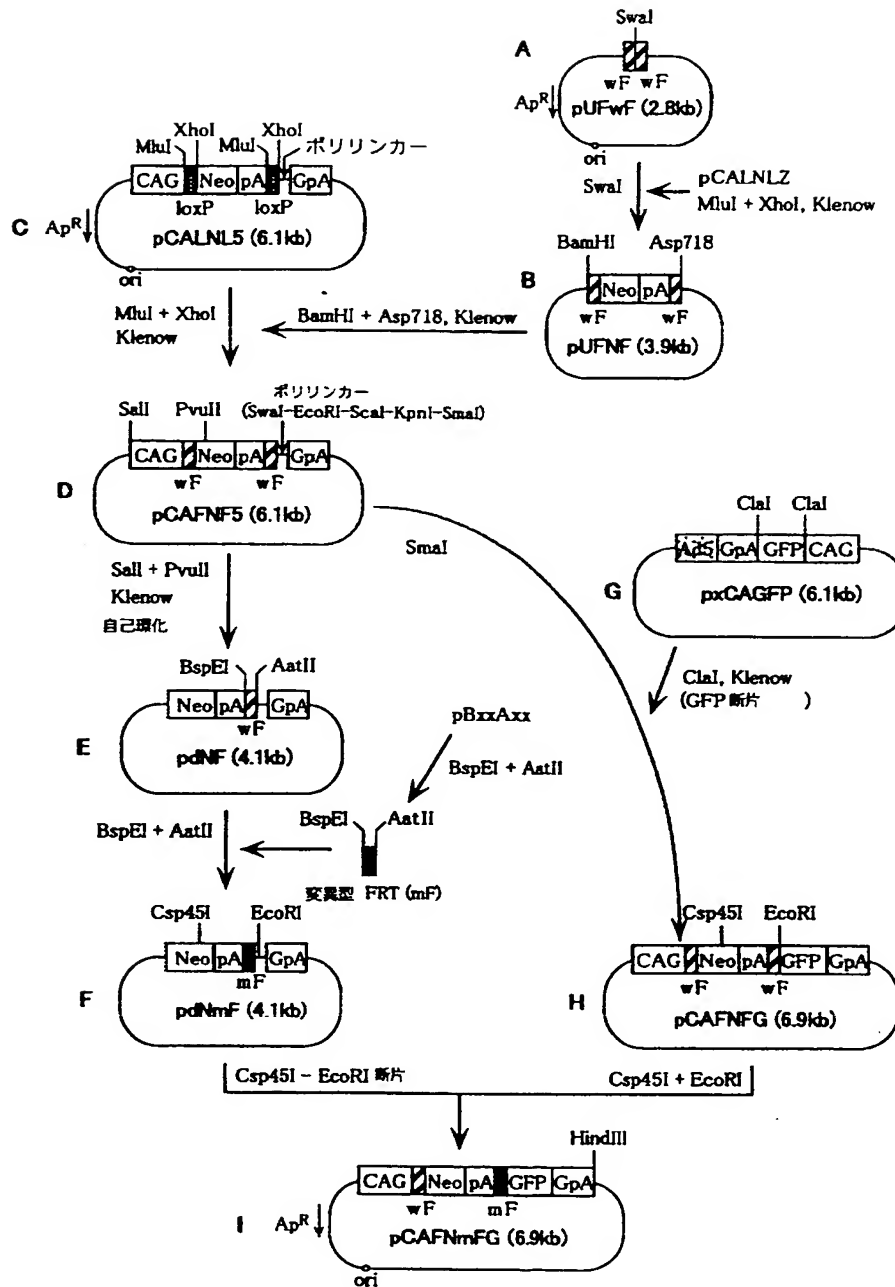
【図 6】



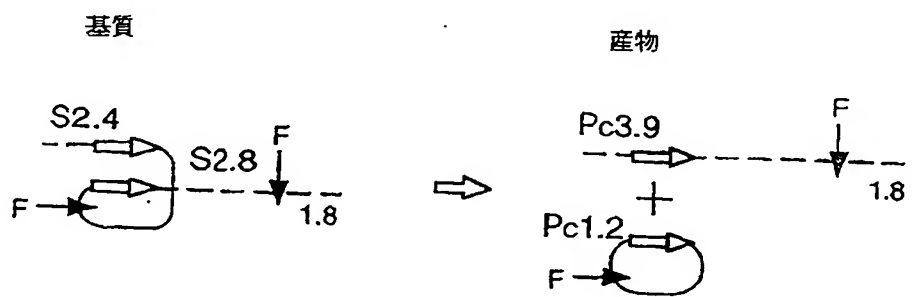
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

リコンビナーゼ F L P の存在下、野生型 F R T 配列とは組換え反応が起きないが、同一配列の 2 つの変異型 F R T 配列間で組換え反応が起こる変異型 F R T 配列を含有した D N A ; 並びに効率の高い遺伝子挿入若しくは遺伝子置換を行う方法等を提供すること。

【解決手段】

変異型 F R T 配列（それぞれ配列番号：2 ～ 5）を含有した D N A ; 該配列のスペーサー領域を除く領域において少なくとも 1 個の塩基の置換を有し、（A）リコンビナーゼ F L P の存在下で野生型 F R T 配列との間で特異的 D N A 組換え反応が起こらず（B）リコンビナーゼ F L P の存在下、同一の配列を有するもう 1 つの変異型 F R T 配列との間で特異的 D N A 組換え反応が起こる変異型 F R T 配列を含有した D N A ; 該 D N A により形質転換された細胞；該 D N A をリコンビナーゼ F L P の存在下に用いる遺伝子置換法、該 D N A を染色体上に有したトランスジェニック動物；該 D N A を含有した医薬；並びに 2 つの変異型 F R T 配列（配列番号：3 2）を用い、リコンビナーゼ F L P の存在下に特異的 D N A 組換え反応を行う方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [599139006]

1. 変更年月日	1999年 9月30日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都渋谷区代々木2丁目37番15-412号
氏 名	斎藤 泉

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 1 8 3 3 7 0]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 9 日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市中央区道修町 2 丁目 2 番 8 号
氏 名	住友製薬株式会社

